

# **Schwefel-Oxygenasen/ -Reduktasen aus *Acidianus ambivalens* und *Halothiobacillus neapolitanus***



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl. Biologe Uwe Pöll

aus Bobstadt

1. Referent: PD Dr. Arnulf Kletzin

2. Referentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 31.08.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2016

Darmstadt 2017

D17

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1. Elementarer Schwefel .....	3
2.2. Die mikrobielle Schwefeloxidation .....	4
2.3. Die Schwefeloxidation bei <i>Bacteria</i> .....	5
2.4. Die Schwefeloxidation bei <i>Archaea</i> .....	9
2.4.1. Schwefeloxidation in <i>Acidianus ambivalens</i> .....	9
2.5. Die Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR) .....	11
2.5.1. Die Reaktion der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase .....	11
2.5.2. Aufbau und Struktur der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase .....	12
2.5.3. Das aktive Zentrum der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase.....	15
2.5.4. Der Reaktionsmechanismus der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase .....	17
2.5.5. Schwefel-Oxygenasen/-Reduktasen verschiedener Mikroorganismen .....	20
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.1. Material.....	23
3.1.1. Chemikalien .....	23
3.1.2. Mikroorganismen .....	24
3.1.3. Plasmide .....	24
3.1.4. Synthetische Oligonukleotide .....	25
3.1.5. Enzyme, Kits und Größenstandards .....	26
3.1.6. Medien.....	26
3.1.7. Puffer und Lösungen .....	27
3.2. Molekularbiologische Methoden .....	29
3.2.1. Zielgerichtete Mutagenese.....	29
3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese .....	30
3.2.3. Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> .....	30
3.3. Biochemische Methoden.....	31
3.3.1. Isolation und Reinigung rekombinanter SOR aus <i>E. coli</i> .....	31
3.3.2. Präparation von SOR/Inhibitor-Komplexen .....	32
3.3.3. Denaturierung und Rückfaltung rekombinanter SOR aus <i>inclusion bodies</i> .....	32
3.4. Analytische Methoden.....	34
3.4.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
3.4.2. Proteinquantifizierung.....	34
3.4.3. SOR-Aktivitätstest .....	35
3.4.4. Thiosulfat-Assay .....	35
3.4.5. Sulfit-Assay .....	36
3.4.6. Schwefelwasserstoff-Assay.....	36
3.4.7. Eisenquantifizierung .....	36

---

3.4.8. Untersuchung der Thiosulfatbildung in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen .....	37
3.4.9. Inhibitor-Assays.....	37
3.5. Spektroskopische Methoden .....	38
3.5.1. UV/VIS-Spektroskopie .....	38
3.5.2. CD-Spektroskopie.....	38
3.5.3. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	39
3.6. Elektronenmikroskopie.....	39
3.7. Röntgenkristallographie .....	40
3.7.1. Kristallisation.....	40
3.7.2. Kristallographische Charakterisierung, Röntgenstrukturanalyse und <i>Refinement</i> .....	42
3.7.3. Modell-Analyse .....	42
3.7.4. Homologie-Modellierung.....	42
3.7.5. Porenanalysen .....	42
3.8. Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) .....	43
<b>Ergebnisübersicht .....</b>	<b>44</b>
<b>4. Die primären Reaktionsprodukte der SOR.....</b>	<b>45</b>
4.1. Einleitung .....	45
4.2. Ergebnisse.....	45
4.3. Diskussion.....	50
<b>5. Neue Inhibitoren der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase .....</b>	<b>52</b>
5.1. Einleitung .....	52
5.2. Ergebnisse.....	54
5.2.1. Identifikation neuer Inhibitoren für die Schwefel-Oxygenase/-Reduktase .....	54
5.2.2. Untersuchung der Inhibitor-Bindungsstellen.....	61
5.3. Diskussion.....	69
<b>6. Charakterisierung von SOR-Derivaten mit Heterometallen .....</b>	<b>73</b>
6.1. Einleitung .....	73
6.2. Ergebnisse.....	74
6.3. Diskussion.....	95
<b>7. Die Kristallstruktur der <i>HnSOR</i>.....</b>	<b>100</b>
7.1. Einleitung.....	100
7.2. Ergebnisse .....	104
7.2.1. Kristallisation und Röntgenkristallographie.....	104
7.2.2. Allgemeine Strukturanalyse .....	107
7.2.3. Poren und Kanäle in der <i>HnSOR</i> .....	110
7.2.4. Das aktive Zentrum der <i>HnSOR</i> .....	117
7.3. Diskussion .....	122

---

7.3.1. Kristallisation und strukturelle Analyse .....	122
7.3.2. Poren und Kanäle in der <i>HnSOR</i> .....	123
7.3.3. Das aktive Zentrum der <i>HnSOR</i> .....	129
<b>8. Mutationsanalysen der Zugangsporen zum aktiven Zentrum.....</b>	<b>133</b>
8.1. Einleitung.....	133
8.2. Ergebnisse .....	135
8.3. Diskussion .....	145
<b>9. Mutationsanalysen der sekundären Koordinationssphäre .....</b>	<b>148</b>
9.1. Einleitung.....	148
9.2. Ergebnisse .....	149
9.3. Diskussion .....	152
<b>10. Allgemeine Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>154</b>
10.1. Die Reaktionsprodukte der SOR.....	154
10.2. Das aktive Zentrum der SOR.....	155
10.2.1. Die konservierten Cysteine .....	155
10.2.2. Das Metallzentrum und das putative Wasserstoffbrückennetzwerk.....	157
10.3. Substrat- und Produktewege innerhalb der SOR .....	158
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>162</b>
<b>Nukleotidalalignments .....</b>	<b>164</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>172</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>181</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>182</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>183</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>184</b>



---

## 1. Zusammenfassung

---

Die Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR) ist das initiale Enzym der Schwefeloxidation im acidothermophilen und chemolithoautotrophen Archaeon *Acidianus ambivalens* (AaSOR). Das Enzym katalysiert eine sauerstoffabhängige Disproportionierung von elementarem Schwefel mit Sulfit, Thiosulfat und Schwefelwasserstoff als nachweisbaren Produkten. Der Reaktionsmechanismus dieser Disproportionierungsreaktion ist jedoch weitestgehend unbekannt.

Das bislang angenommene Temperaturspektrum der AaSOR erstreckt sich über einen Bereich von 50 - 108 °C. Die Optimierungen des SOR-Aktivitätstests und der zugehörigen Nachweisreaktionen in dieser Arbeit ergaben, dass die AaSOR auch bei niedrigeren Temperaturen von bis zu 10 °C aktiv ist. Eine SOR-Aktivität im Temperaturbereich unter 50 °C ist somit nicht länger als spezielle Adaption von SORs an mesophile Habitate anzusehen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Thiosulfat kein primäres Reaktionsprodukt der SOR darstellt, sondern ausschließlich durch eine chemische, nichtenzymatische Reaktion von Sulfit und elementarem Schwefel bei hohen Temperaturen gebildet wird.

Das aktive Zentrum der AaSOR umfasst drei hochkonservierte Cysteine (C<sub>31</sub>, C<sub>101</sub> und C<sub>104</sub>), von denen C<sub>31</sub> persulfuriert vorliegt (CSS<sub>31</sub>) und aufgrund der für die Katalyse essentiellen Funktion als Substratbindungsstelle vermutet wird. Zur Überprüfung dieser These wurden organische, schwefelhaltige Moleküle gesucht, die als Substratanaloga einen inhibitorischen Effekt auf die SOR ausüben. Als geeignet stellten sich die Oligosulfid-Verbindungen Diallyltrisulfid, Dimethyldisulfid, Di-*tert*-butyl-Polysulfid und artifizielles Knoblauchöl heraus. Die Identifikation der zugehörigen Bindungsstellen erfolgte mittels Röntgenkristallographie. Die Kristallstrukturen wiesen eine Modifikation aller drei konservierten Cysteine ohne spezifische Modifikation einer einzelnen Aminosäure im aktiven Zentrum auf. Die Funktion von CSS<sub>31</sub> als Substratbindungsstelle konnte auf diesem Weg nicht verifiziert werden.

Neben den drei konservierten Cysteinen umfasst das aktive Zentrum der SOR ein mononukleäres Eisenatom, das durch eine faciale 2-His-1-Carboxylat-Triade und zwei Wassermoleküle koordiniert wird. Die sekundäre Koordinationssphäre wird durch E<sub>87</sub> gebildet, das über eine Wasserstoffbrückenbindung in Kontakt mit dem Eisenliganden H<sub>86</sub> steht. Die Substitution von E<sub>87</sub> zu Alanin bewirkte eine Aktivitätsverringerung auf 26 %, wohingegen die Mutante E<sub>87</sub>D eine zum Wildtyp vergleichbare Aktivität aufwies. Die sekundäre Koordinationssphäre wirkt über die Wasserstoffbrückenbindung entscheidend auf das Eisenzentrum und die enzymatische Aktivität ein. Frühere ESR-Experimente zeigten, dass die Inkubation des Enzyms zusammen mit Schwefel bei hohen Temperaturen einen Wechsel des Redoxzustands von Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> bewirkt. Um zu prüfen, ob dieser Wechsel einen essentiellen Bestandteil der SOR-Katalyse darstellt, wurde das im aktiven Zentrum der SOR enthaltene Eisen durch hochreines Cobalt, Gallium, Mangan und Nickel

---

substituiert. Alle SOR-Derivate waren biochemisch aktiv. Co- und Mn-SOR zeigten für  $\text{Co}^{2+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Spezies charakteristische ESR-Signale, die auch nach der Inkubation mit Schwefel bei hohen Temperaturen erhalten blieben. Der Oxidationszustand der Substitutionsmetalle blieb bei der Katalyse unverändert. Dies lässt darauf schließen, dass kein Redoxwechsel des Metallzentrums bei der Sauerstoffaktivierung nötig ist. Untersuchungen der Kristallstrukturen lieferten keine neuen Erkenntnisse bezüglich struktureller Unterschiede in den aktiven Zentren der SOR-Derivate. Sowohl die Analysen mittels Röntgenfluoreszenzspektroskopie als auch die Daten der anomalen Dispersion ergaben, dass die Metallzentren neben den eingebrachten Substitutionsmetallen auch von unerwünschten Metallionen besetzt waren. ICP-MS-Analysen der unter hochreinen Bedingungen präparierten SOR-Derivate bestätigten, dass die festgestellten Kontaminationen im Rahmen des Kristallisationsprozesses oder der Kristallpräparation eingebracht wurden.

Die in einer früheren Arbeit begonnene strukturelle Charakterisierung der SOR aus dem mesophilen  $\gamma$ -Proteobakterium *Halothiobacillus neapolitanus* (*HnSOR*) wurde in dieser Arbeit fortgesetzt. Es gelang eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,1 Å zu erhalten, wobei Proteinarchitektur und aktives Zentrum eine hohe Ähnlichkeit zur *AaSOR* aufweisen. Neben der bereits bekannten Persulfurierung von C<sub>33</sub> wurde auch an den beiden Cysteinen C<sub>103</sub> und C<sub>106</sub> ein zusätzliches Schwefelatom beobachtet. C<sub>103</sub> und C<sub>106</sub> scheinen dabei über eine Tetrasulfidbrücke miteinander verbunden zu sein. Das mononukleäre Eisenzentrum wird, wie bei der *AaSOR*, von drei Aminosäuren (H<sub>88</sub>, H<sub>92</sub> und E<sub>116</sub>) und zwei Wassermolekülen koordiniert. Die sekundäre Koordinationssphäre wird nicht von dem zu E<sub>87</sub> der *AaSOR* homologen E<sub>89</sub> gebildet, sondern von einem Tyrosin (Y<sub>118</sub>). E<sub>89</sub> hingegen scheint im Mittelpunkt eines weitläufigen Wasserstoffbrückennetzwerks im aktiven Zentrum zu stehen, das möglicherweise entscheidend zur Stabilität des Enzyms beiträgt und so die im Vergleich zur *AaSOR* geringere Anzahl an internen Salzbrücken kompensiert. Die bislang postulierten Substrat- und Produkttrouten innerhalb des Enzyms wurden durch softwaregestützte Analysen in der neuen *HnSOR*- Kristallstruktur überprüft. Der bislang als Ausgang aus dem Enzym angesehene Trimerkanal kann aufgrund eines zu geringen Durchmessers und mangelnder Flexibilität der beteiligten Aminosäuren nicht als solcher fungieren. Zwei neu identifizierte Verbindungen mit der Enzymoberfläche könnten jedoch diese Funktion übernehmen. Die vermuteten Verbindungen zwischen aktivem Zentrum und der inneren Kavität der SOR über eine Eingangs- und eine Ausgangspore wurden dagegen bestätigt. Zudem wurde eine dritte Pore zum aktiven Zentrum beobachtet, die am essentiellen CSS<sub>33</sub> lokalisiert ist und deren Öffnungszustand von der Konformation der Aminosäure M<sub>303</sub> abhängt. Bei der *AaSOR* weisen hingegen Mutations- und Porenanalysen darauf hin, dass das aktive Zentrum dieser SOR lediglich durch eine einzige Pore mit der inneren Kavität verbunden ist.

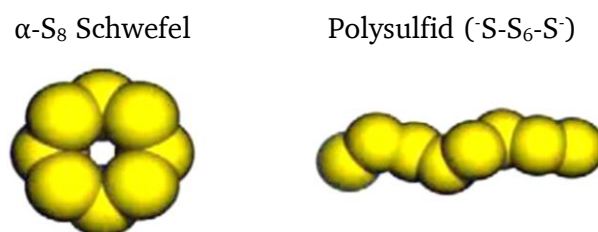
---

## 2. Einleitung

---

### 2.1. Elementarer Schwefel

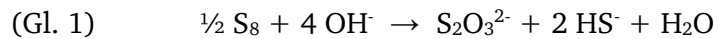
Mit einer mittleren Häufigkeit von 0,05 % (bezogen auf die Masse) ist Schwefel das am 16. häufigsten vorkommende Element der Lithosphäre. Besonders reich an Schwefel und anorganischen Schwefelverbindungen sind vulkanische Quellen. Sie stellen eine Nettoquelle für den Schwefelnachschub aus abiogenen Regionen dar. Diese Geothermalstandorte sind besonders in der Umgebung von aktiven Vulkanen und an Stellen mit relativ dünner Erdkruste konzentriert (Dopson & Johnson, 2012). Aufgrund der möglichen Oxidationszustände und der Reaktivität der freien Elektronenpaare ist Schwefel eines der interessantesten Elemente. Schwefel kann in neun unterschiedlichen Oxidationszuständen existieren, die von  $-II$  (Schwefelwasserstoff) bis zu  $+VI$  (Sulfat) reichen. Das am häufigsten in der Natur vorkommende Allotrop des elementaren Schwefels ( $S^0$ ) ist der zyklische, orthorhombische  $\alpha$ - $S_8$ -Schwefel (Abb. 1) mit einer charakteristischen Kronenform. Bei Temperaturen über  $95,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  wird der orthorhombische  $\alpha$ - $S_8$ -Schwefel in monoklinen  $\beta$ - $S_8$ -Schwefel konvertiert, der nur bei erhöhten Temperaturen stabil vorliegt (Steudel, 2000). Aufgrund seiner hohen Hydrophobizität ist  $S_8$  mit einer Löslichkeit von lediglich  $19\text{ nM}$  ( $5\text{ }\mu\text{g/L}$ ) bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  nahezu unlöslich in Wasser (Boulegue, 1978), was dessen Bioverfügbarkeit für Mikroorganismen deutlich erschwert. Eine Temperaturerhöhung auf  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  steigert die Löslichkeit von  $S_8$  auf bis zu  $478\text{ nM}$  (Kamyshny, 2009). Somit steigt auch die Bioverfügbarkeit von  $S^0$  in Habitaten mit erhöhten Temperaturen deutlich an und ist dadurch für (hyper-)thermophile, schwefeloxidierende Mikroorganismen leichter verfügbar. Mesophile schwefeloxidierende Mikroorganismen hingegen müssen den Schwefel vor dessen Oxidation durch eine Aktivierung erst verfügbar machen. Dies kann zum einen durch einen nukleophilen Angriff auf den  $S_8$ -Ring erfolgen, wodurch ein Polysulfan entsteht, oder über eine Reduktion zu wasserlöslichen Polysulfiden. Solch lineare, hochreaktive Schwefelspezies (z.B. Polysulfid; Abb. 1) stellen mit höchster Wahrscheinlichkeit das eigentliche initiale Substrat schwefeloxidierender Enzyme dar. Beide Reaktionen können durch reaktive Thiolgruppen von Cysteinen in Proteinen vermittelt werden (Rohwerder und Sand, 2007a; Franz *et al.*, 2007).



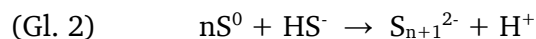
**Abbildung 1:** Schematische Darstellungen von  $\alpha$ - $S_8$ -Schwefel (links) und Polysulfid (rechts). Die Kettenlänge des Polysulfids ist hypothetisch und variiert in Abhängigkeit des Gleichgewichts von Schwefel und Schwefelwasserstoff. Tetra- und Pentasulfide sind bei  $\text{pH} > 6$  die prädominanten Polysulfide (Giggenbach, 1971).

---

Bei Raumtemperatur ist elementarer Schwefel sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen bei saurem bis neutralen pH stabil. Im alkalischen Milieu hingegen findet eine Disproportionierungsreaktion (Gl. 1) zu Thiosulfat und Sulfid statt (McC Campbell Hamilton, 1991; Roy & Trudinger, 1970).



Bei Raumtemperatur ist für diese Reaktion ein pH-Wert von mindestens 11,5 nötig. Bei höherer Temperatur von 80 °C findet diese Reaktion, durch die gesteigerte chemische Aktivität des Schwefels, bereits ab einem pH-Wert von 7,6 statt. Auch bei saurem pH kann eine Disproportionierung von  $\text{S}^0$  stattfinden, jedoch erst bei Temperaturen über 150 °C. In Gegenwart von Sulfid werden bei neutralem und alkalischem pH Polysulfide aus  $\text{S}^0$  gebildet, die unter anaeroben Bedingungen stabil in wässrigen Lösungen vorliegen (Gl. 2).



Unter aeroben und sauren Bedingungen findet hingegen eine Hydrolyse des Polysulfids zu  $\text{S}^0$  und Sulfid statt (Steudel, 2000; Schauder und Kröger, 1993).

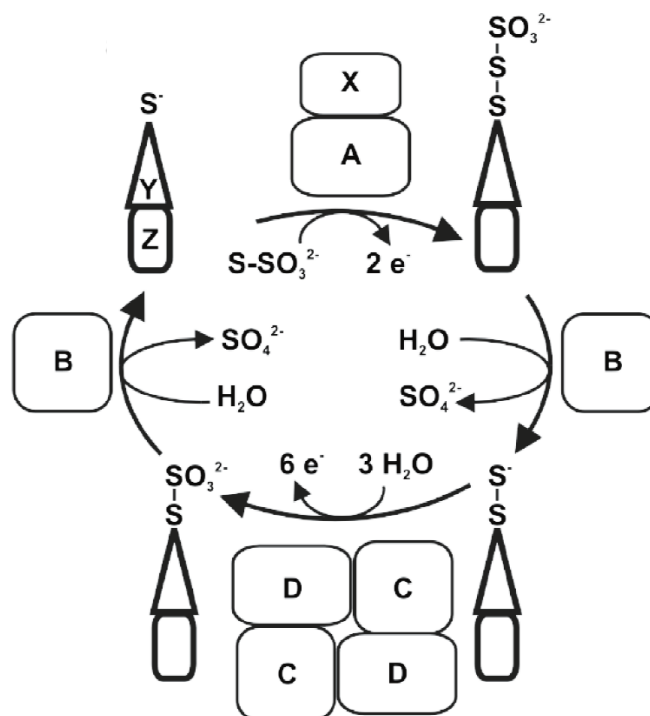
## 2.2. Die mikrobielle Schwefeloxidation

Die mikrobielle Oxidation von Schwefel und reduzierten Schwefelverbindungen ist die vorrangige biologische Reaktion in vulkanischen Habitaten und extremen Umgebungen, findet jedoch auch in Böden und Gewässern statt. Die oxidativen Reaktionen werden sowohl von *Bacteria* als auch *Archaea* durchgeführt und stellen für diese Organismen einen der wichtigsten Wege der Energiegewinnung dar (Friedrich, 2005). Während die Schwefeloxidation bei *Archaea* weitestgehend auf die thermoacidophilen *Sulfolobales* limitiert ist, existiert eine Vielfalt sich taxonomisch und ökologisch unterscheidender lithotropher Bakterien, die ein breites Spektrum an reduzierten anorganischen Schwefelverbindungen oxidieren können (Gosh & Dam, 2009). Diese Vielfalt an Schwefelverbindungen wird durch die große Varianz an möglichen Oxidationszuständen des Schwefels (-II bis +VI) erreicht. So können Sulfide ( $\text{HS}^-$ ), Metallsulfide wie Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ), Polysulfide ( $\text{S}_n\text{-SH}$ ), elementarer Schwefel ( $\text{S}^0$ ), Sulfit ( $\text{HSO}_3^-$ ), Thiosulfat ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) und Polythionate (z.B. Tetrathionat  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ) als Substrate genutzt werden. Chemolithotrophe *Bacteria* und *Archaea* nutzen die Oxidation anorganischer Schwefelverbindungen zur Energiekonservierung, indem Elektronen in die Atmungskette eingeschleust werden. Phototrophe *Bacteria* hingegen nutzen diese Verbindungen hauptsächlich als Elektronendonatoren bei der  $\text{CO}_2$ -Fixierung (Ghosh & Dam, 2009; Frigaard und Dahl, 2009).

## 2.3. Die Schwefeloxidation bei *Bacteria*

Eine Vielfalt sich taxonomisch und ökologisch unterscheidender Bakterien ist in der Lage, ein breites Spektrum an reduzierten anorganischen Schwefelverbindungen zu oxidieren. Dabei existieren unterschiedliche Enzyme, Reaktionswege, Mechanismen des Elektronentransports und der Energiekonservierung bei diversen phototrophen und chemotrophen Spezies nebeneinander (Gosh & Dam, 2009).

Das Sox (sulfur oxidizing)-System ist das am besten verstandene Schwefeloxidationssystem. Hierbei handelt es sich um ein Enzymsystem, das Thiosulfat, Sulfit, aber auch Sulfid und elementaren Schwefel zu Sulfat oxidiert und Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor nutzt. Aufgrund der periplasmatischen Lokalisation ist keine Substrataufnahme ins Cytoplasma nötig. Das Sox-System ist der zentrale Reaktionsweg der Schwefeloxidation bei vielen lithotropen und zumeist neutralophilen  $\alpha$ -Proteobakterien und wurde detailliert für *Paracoccus pantotrophus* charakterisiert. Bei *P. pantotrophus* setzt es sich aus den vier periplasmatischen Enzymkomplexen SoxAX, SoxB, SoxCB und SoxYZ zusammen (Friedrich *et al.*, 2008). Abbildung 2 zeigt den Reaktionskreislauf des Sox-Enzymsystems am Beispiel der Thiosulfatoxidation in *P. pantotrophus*.



**Abbildung 2:** Modell des Reaktionskreislaufs der Thiosulfatoxidation durch das Sox-Enzymsystem in *Paracoccus pantotrophus* (modifiziert; Friedrich *et al.*, 2008).

Zu Beginn katalysiert SoxAX den oxidativen Transfer von Thiosulfat auf die Thiolgruppe eines konservierten Cysteins von SoxYZ. Bei SoxYZ handelt es sich um ein zentrales Trägerprotein, das die Reaktionsintermediate über den gesamten Reaktionszyklus hinweg kovalent gebunden auf

---

einem flexiblen Peptidarm trägt. Im nächsten Schritt katalysiert die Thiohydrolase SoxB die hydrolytische Abspaltung von Sulfat von der S-Thiosulfonat-Spezies an SoxYZ. Das resultierende Cysteinpersulfid wird durch die Schwefel-Dehydrogenase SoxCD weiter zu Cystein-S-Sulfat oxidiert, wobei Elektronen auf periplasmatisches Cytochrom c übertragen werden. Dem folgt eine erneute Sulfatabspaltung durch SoxB (Rother *et al.*, 2001; Friedrich *et al.*, 2005; Friedrich *et al.*, 2008). Neben dem hier beschriebenen Sox-System existieren Beispiele von verkürzten Formen des Sox-Systems, wie bei photolithotrophen Vertretern der *Chromatiaceae* oder *Chlorobi* (Gosh & Dam, 2009). So fehlt dem Sox-System der grünen Schwefelbakterien die Komponente SoxCD. Die Funktion der Sulfatbildung wird hier durch eine dissimilatorische Sulfit-Reduktase (DSR) übernommen (Gregersen *et al.*, 2011). Bei Schwefelpurpurbakterien mit unvollständigem Sox-System wie *Allochromatium vinosum* wurde die intermediäre Bildung von Schwefelglobuli als Folge der fehlenden Schwefel-Dehydrogenase SoxCD beobachtet (Hensen *et al.*, 2006; Grimm *et al.*, 2008). Das bei der Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat entstandene Cysteinpersulfid am Trägerprotein SoxYZ kann nicht direkt oxidiert werden und die Schwefelgruppe wird daher auf bislang unbekanntem Weg auf Schwefelglobuli übertragen (Hensen *et al.*, 2006). Diese können unter Beteiligung einer dissimilatorischen Sulfitreduktase abgebaut und oxidiert werden (Frigaard und Dahl, 2009).

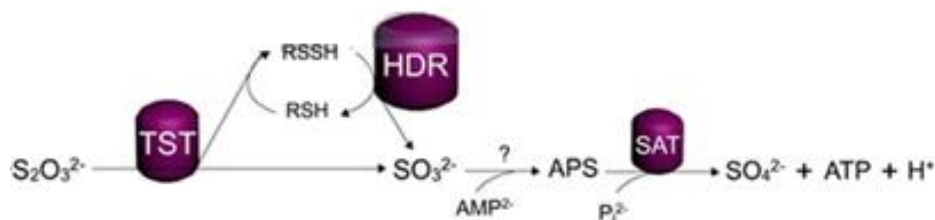
In mesoacidophilen schwefeloxidierenden Bakterien wie *Acidithiobacillus* und *Acidiphilium* spp. wird elementarer Schwefel nicht durch das Sox-System, sondern durch eine thiolabhängige Dioxygenase (SDO) oxidiert. Die bakteriellen SDOs weisen Ähnlichkeit zum humanen ETHE1 auf, das an der Entgiftungsreaktion von Sulfid in der mitochondrialen Matrix beteiligt ist. SDOs gehören der Familie der Metallo- $\beta$ -Lactamasen an und katalysieren in Gegenwart von reduziertem Glutathion (GSH) die Oxidation von  $S^0$  zu Sulfid. Oxidiert wird dabei der Sulfan-Schwefel des eigentlichen Substrats, Glutathion-Persulfid (Rohwerder & Sand, 2008; Wang *et al.*, 2014; Kabil, 2012; Liu *et al.*, 2014). Kürzlich erfolgte die strukturelle und biochemische Analyse der bakteriellen SDOs von *Pseudomonas putida* und *Myxococcus xanthus*. Sie weisen eine homodimere Struktur auf und besitzen mononukleäre Eisenzentren (Sattler *et al.*, 2015). Verglichen mit dem strukturell und mechanistisch gut verstandenen Sox-System sind der Reaktionsmechanismus der SDO und deren Einbindung in das Schwefeloxidationssystem von *Acidithiobacillus* spp. weitgehend unverstanden. Das Schema in Abbildung 3 zeigt die SDO in einem Modell der Schwefeloxidation auf der periplasmatischen Seite, was keineswegs als gesichert gelten muss, da das Protein keine Signalsequenz besitzt. Nach diesem Modell transportiert ein Membranprotein (*outer membrane protein* (OMP)), durch einen noch nicht vollständig identifizierten Mechanismus, Octasulfanschwefel ( $S_8$ ) in den periplasmatischen Raum (PS). Dabei wird der elementare Schwefel durch reaktive Thiolgruppen (R-SH) des OMP zu einem Polysulfanintermediat (R-S-S-H) aktiviert.



\_\_\_\_\_

Heterodisulfid-Reduktase-Komplex (HDR). Bislang erfolgte jedoch keine biochemische Charakterisierung, weshalb die Existenz dieses Enzymkomplexes spekulativ bleibt (Quatrini *et al.*, 2009). Auch in einem hypothetischen Modell der Schwefeloxidation von *Acidithiobacillus caldus* wird die HDR als Teil eines Reaktionsweges der Thiosulfatoxidation vermutet (Abb. 4). Thiosulfat dient als Substrat einer Thiosulfat-Schwefel-Transferase (TST). In einem Reaktionszyklus wird ein Schwefelatom durch die TST auf ein Thiolprotein (RSH), mit RSSH als Produkt, übertragen. Im nächsten Teil des Zyklus wird RSSH, unter Bildung von Sulfit und Regeneration von RSH, durch die HDR oxidiert und Elektronen an den Chinonpool der inneren Membran übertragen. Für die weitere Oxidation von Sulfit wird eine Substratketten-phosphorylierung vermutet, die über Adenosinphosphosulfat (APS) und durch eine Sulfat-Adenyl-Transferase zur Bildung von Sulfat und ATP führt (Chen *et al.*, 2012).

Die HDR in *Ab. caldus* arbeitet somit in entgegengesetzter Richtung zu den HDRs von methanogenen *Archaea*. Diese katalysieren die reversible Reduktion der Disulfidbindung des Heterodisulfids CoM-S-S-CoB, gekoppelt an einen Elektronentransfer (Hedderich *et al.*, 2005).



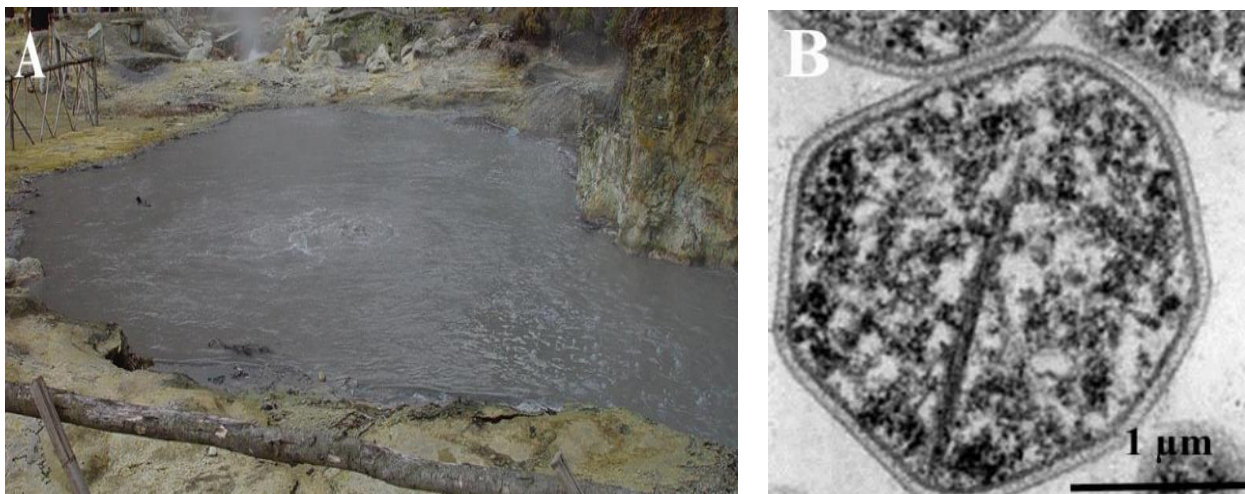
**Abbildung 4:** Hypothetischer Reaktionsweg der Thiosulfatoxidation in *Acidithiobacillus caldus* durch den Heterodisulfid-Reduktase-Komplex. TST = Thiosulfat-Schwefel-Transferase; HDR = Heterodisulfid-Reduktase-Komplex; SAT = Sulfat-Adenyl-Transferase. (modifiziert; Chen *et al.*, 2012)

Ein weiterer Weg der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen in vielen *Acidithiobacillus*-Arten ist der S<sub>4</sub>I-Weg. In *Ab. caldus* ist er ein bedeutender Weg der Schwefeloxidation im Periplasma, wobei ein Reaktionszyklus die Hydrolyse von Tetrathionat mit der Oxidation von Thiosulfat verknüpft. Periplasmatisches Thiosulfat wird durch eine Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase zu Tetrathionat oxidiert und in einer Folgereaktion durch eine Tetrathionat-Hydrolase wieder hydrolysiert. Bei der Oxidation zu Tetrathionat werden Elektronen dem Chinonpool zugeführt. Die neben Thiosulfat entstehenden Produkte sind bislang rein spekulativ. Zudem wird vermutet, dass die Bildung von Tetrathionat durch den S<sub>4</sub>I-Weg eine wichtige Rolle bei der Speicherung von Schwefel spielt (Chen *et al.*, 2012). In einigen Bakterien wurden zudem die Gene der aus Archaeen bekannten Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR) nachgewiesen (siehe Kap. 2.5.5).



## 2.4. Die Schwefeloxidation bei *Archaea*

Die Nutzung von elementarem Schwefel und anorganischen Schwefelverbindungen zur Energiekonservierung ist eine verbreitete Eigenschaft von (hyper-)thermophilen *Archaea*. Besonders in vulkanischen Habitaten sind hohe Mengen anorganischer Schwefelverbindungen in einer großen Vielfalt vorzufinden, die von chemolithoautotrophen Organismen als vorrangige Energiequelle genutzt werden. So zählen Hydrothermalquellen, Solfataren, Fumarolen und andere schwefelreiche Umgebungen zu den typischen Habitaten dieser *Archaea* (Fumarole Abb. 5 A). Ein Großteil der isolierten schwefeloxidierenden *Archaea* gehört der Ordnung der *Sulfolobales* an (Kletzin, 2008). Aus dieser Ordnung hat sich *Acidianus ambivalens* (Abb. 5 B) zu einem Modellorganismus für den Schwefelmetabolismus in *Archaea* entwickelt.

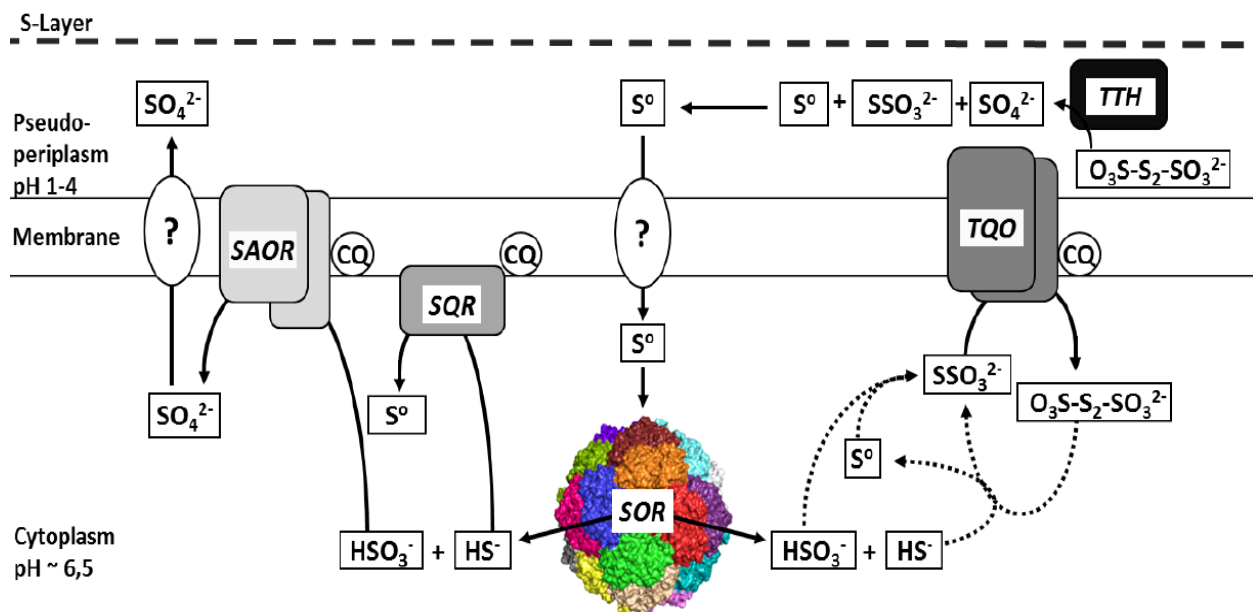


**Abbildung 5:** (A) Fumarole in der Lagune von Furnas auf São Miguel (Azoren, Portugal; Bild: A. Kletzin). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes von *Ac. ambivalens* (Bild: W. Zillig).

### 2.4.1. Schwefeloxidation in *Acidianus ambivalens*

*Acidianus ambivalens* ist ein hyperthermophiles, acidophiles und chemolithoautotrophes Archaeon aus der Ordnung der *Sulfolobales* innerhalb der *Crenarchaeota* (Zillig *et al.*, 1985; Zillig *et al.*, 1986; Fuchs *et al.*, 1996). Optimale Wachstumsbedingungen sind eine Temperatur von 80 °C und ein pH-Wert von 2,5. Der fakultativ anaerobe Organismus ist in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen in der Lage, Schwefel zu reduzieren oder zu oxidieren. Aufgrund dieser Eigenschaften hat sich *Ac. ambivalens* als Modellorganismus für den Schwefelmetabolismus bei hyperthermophilen *Archaea* etabliert. Bei aerobem Wachstum oxidiert *Ac. ambivalens* elementaren Schwefel zu Schwefelsäure (Abb. 6). Der Ablauf der Schwefelmobilisierung und dessen Aufnahme ins Cytoplasma sind noch unbekannt. Der initiale Schritt der Schwefeloxidation wird von der im Cytoplasma lokalisierten Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR) katalysiert. Das Enzym

katalysiert eine sauerstoffabhängige Disproportionierung von elementarem Schwefel zu Sulfid und Schwefelwasserstoff.



**Abbildung 6:** Hypothetisches Modell der Oxidation von elementarem Schwefel in *Acidianus ambivalens* (abgewandelt nach Kletzin, 2008). SAOR = Sulfat:Akzeptor-Oxidoreduktase; SQR = Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase; SOR = Schwefel-Oxygenase/-Reduktase; TQO = Thiosulfat:Chinon-Oxidoreduktase; TTH = Tetrathionat-Hydrolase; CQ = Caldariella Chinon. Durchgehende Pfeile, enzymatische Reaktionen; gepunktete Pfeile, nicht-enzymatische Reaktionen.

In einer temperaturabhängigen, nicht-enzymatischen Reaktion wird Thiosulfat aus Sulfid und elementarem Schwefel gebildet, wobei unklar war, ob Thiosulfat auch als primäres Produkt der SOR gebildet wird. Die Reaktion der SOR trägt nicht direkt zur Energiekonservierung bei. Membrangebundene Oxidoreduktasen nutzen die SOR-Produkte als Substrate und koppeln deren Oxidation mit der Elektronentransportkette. Thiosulfat wird durch die heterodimere Thiosulfat:Chinon-Oxidoreduktase (TQO; Müller *et al.*, 2004) zu Tetrathionat oxidiert. Eine Sulfat:Akzeptor-Oxidoreduktase (SAOR; Zimmermann *et al.*, 1999), die bislang nur durch Aktivitätsbestimmungen nachgewiesen wurde, oxidiert Sulfid weiter zu Sulfat. Die Oxidation von Sulfid zu elementarem Schwefel wird von der Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase katalysiert (Brito *et al.*, 2009). Nach der Oxidation der Substrate werden Elektronen an den Chinonpool (Caldariella-Chinon, CQ) der Membran geliefert und in die Elektronentransportkette eingebracht. Diese umfasst eine TypII NADH:Chinon-Oxidoreduktase (Gomes *et al.*, 2001), eine Typ E Succinat:Chinon-Oxidoreduktase (Gomes *et al.*, 1999) und den Cytochrom-*ba*-Komplex, einem Analogon zu dem zuvor nur aus *Bacteria* und *Eukarya* bekannten Cytochrom-*bc*<sub>1</sub>-Komplex (Bandeiras *et al.*, 2009). Der Cytochrom-*aa*<sub>3</sub>-Komplex, eine terminale Chinol:Sauerstoff-Oxidoreduktase, überträgt abschließend Elektronen von Caldariella-Chinol auf Sauerstoff, wobei ein Protonengradient über die Membran zur ATP-Synthese generiert wird (Anemüller *et al.*, 1994;

---

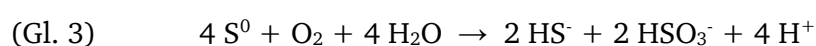
Giuffré *et al.*; 1997; Das *et al.*, 2004). Darüber hinaus kann die ATP-Synthese durch Substratkettenphosphorylierung erfolgen (Zimmermann *et al.*, 1999). Wird *Ac. ambivalens* in tetrathionathaltigem Medium kultiviert, kann Tetrathionat durch eine extrazelluläre Tetrathionat-Hydrolase (TTH; Protze *et al.*, 2011) in Sulfat, Thiosulfat und elementaren Schwefel umgewandelt werden.

## 2.5. Die Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR)

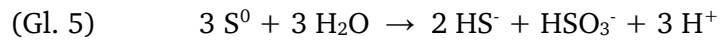
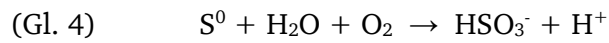
### 2.5.1. Die Reaktion der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase

Schwefel-Oxygenasen/-Reduktasen katalysieren eine sauerstoffabhängige Disproportionierung von elementarem Schwefel mit Sulfit, Thiosulfat und Schwefelwasserstoff als nachweisbare Produkte. Für die Katalyse werden keine externen Cofaktoren benötigt. In *Archaea* ist die SOR das einzige bekannte Enzym, das eine Oxidation von elementarem Schwefel katalysiert und stellt in *Ac. ambivalens* das initiale Enzym der Schwefeloxidation dar (AaSOR). An ihr erfolgte zuerst der Nachweis einer gekoppelten Produktion von Sulfit, Thiosulfat und Schwefelwasserstoff (Kletzin, 1989). Die AaSOR ist nur unter aeroben Bedingungen aktiv, jedoch nicht unter H<sub>2</sub>- oder N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Anhand der SOR von *A. brierleyi* konnte ein moderater Einbau von <sup>18</sup>O in Sulfit nachgewiesen werden (Emmel *et al.*, 1986). Eine Aktivität der AaSOR wurde im Bereich von 50 bis 108 °C und einem pH-Wert zwischen 4 und 8 beobachtet mit optimalen Reaktionsbedingungen bei einer Temperatur von 85 °C und einem pH-Wert zwischen 7,0 und 7,4 (Kletzin, 1989). Unklar war jedoch, ob Thiosulfat ein primäres Reaktionsprodukt der SOR-Reaktion darstellt oder lediglich als Produkt einer schnellen, nicht-enzymatischen Reaktion von Sulfit mit elementarem Schwefel bei Temperaturen über 50 °C entsteht (Roy & Trudinger, 1970; Kletzin, 1989).

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit von H<sub>2</sub>S ist die Bestimmung der Produktstöchiometrien problematisch und die Produkte der Reduktasereaktion sind lediglich in unterstöchiometrischen Mengen nachweisbar. Zur Verminderung dieser entweichenden Mengen an H<sub>2</sub>S wurden die Reaktionsprodukte in Gegenwart von Zinkacetat im Reaktionspuffer quantifiziert, um H<sub>2</sub>S zu fällen. Hieraus ergab sich eine kalkulierte Stöchiometrie von 1:1 zwischen den Produkten der Oxygenase- und Reduktasereaktion (Kletzin, 1989). Basierend auf dieser Kalkulation wurde folgende Gesamtgleichung der SOR-Reaktion aufgestellt:



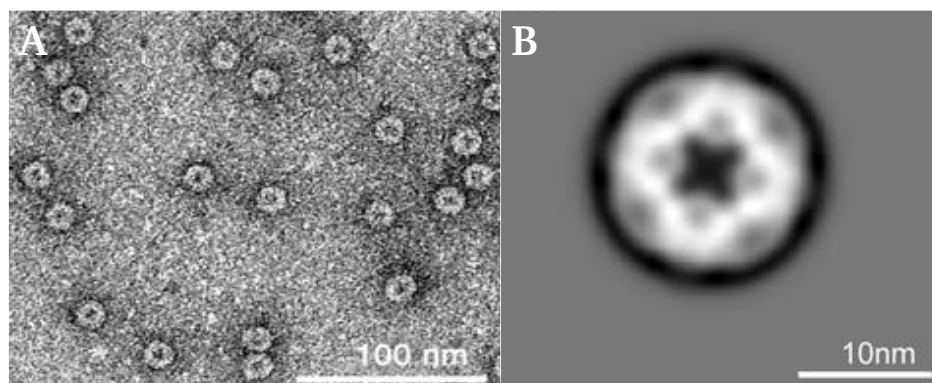
Die Gesamtgleichung lässt sich wiederum in eine Oxygenase-Reaktion (Gl. 4) und eine Disproportionierungsreaktion (Gl. 5) aufteilen:



Die  $K_m$ -Werte für Schwefel (basierend auf  $\text{S}^0$ ), wurden für Oxygenase- und Reduktasereaktion separat ermittelt und betrugen 23 mM (Ox.) und 13 mM (Red.) mit  $K_{\text{cat}}$ -Werten von  $2,2 \text{ s}^{-1}$  (Ox.) und  $0,1 \text{ s}^{-1}$  (Red.) (Urich *et al.*, 2004).

### 2.5.2. Aufbau und Struktur der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase

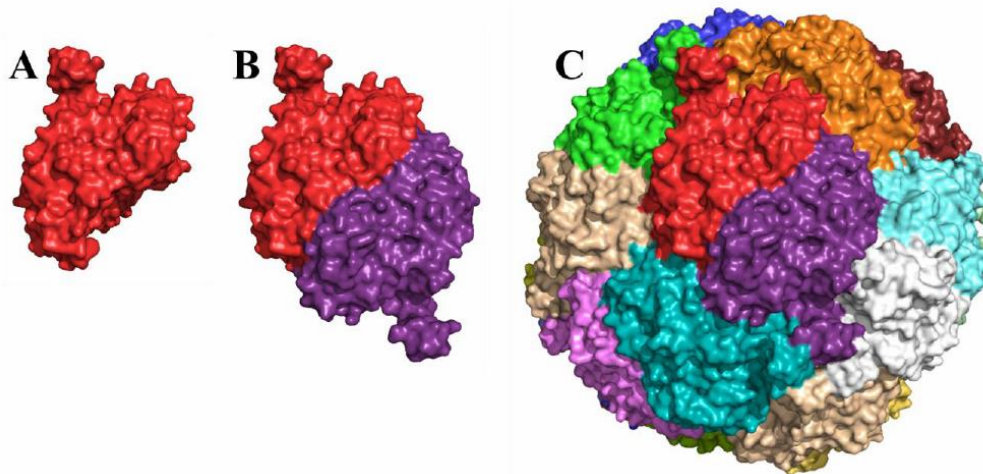
Die SOR ist aus 24 identischen Untereinheiten aufgebaut, die ein kugelförmiges Holoenzym mit einer zentralen Kavität bilden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der isolierten AaSOR ließen diese sphärische Struktur des Enzyms mit einem Durchmesser von 15 nm erkennen (Kletzin, 1989; Urich *et al.*, 2004; Abb. 7).



**Abbildung 7:** (A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen der AaSOR mit Negativkontrastierung. Der Balken repräsentiert eine Größe von 100 nm. (B) Ergebnisse der Einzelpartikel-Mittelung von untersuchten SOR-Partikeln. Der Balken repräsentiert eine Größe von 10 nm (Urich *et al.*, 2004).

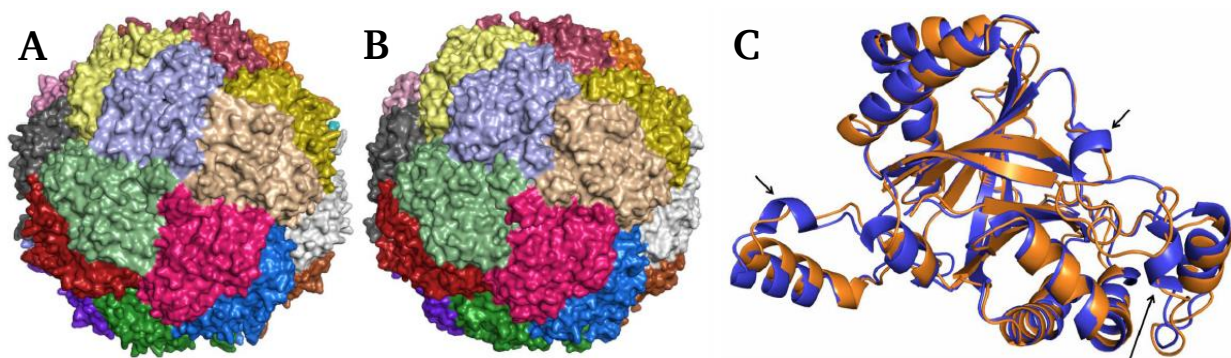
Durch reversible Denaturierung wurde nachgewiesen, dass Homodimere die Ausgangsbasis für die Assemblierung des SOR-Holoenzym mit einer molekularen Masse von 840 kDa darstellen (Urich *et al.*, 2004; Abb. 8). Immunogold-Elektronenmikroskopie mit SOR-spezifischen Antikörpern zeigte für die SOR von *Ac. tengchongensis* (AtSOR) eine Lokalisation im Cytoplasma und eine schwache Membranassoziation des Enzyms. Aufgrund der partiellen Kolokalisation der AtSOR mit der Thiosulfat:Akzeptor-Oxidoreduktase und der Sulfid:Akzeptor-Oxidoreduktase an der Cytoplasmamembran von *Ac. tengchongensis* wurde eine funktionale Kopplung dieser Enzyme vermutet (Chen *et al.*, 2005).





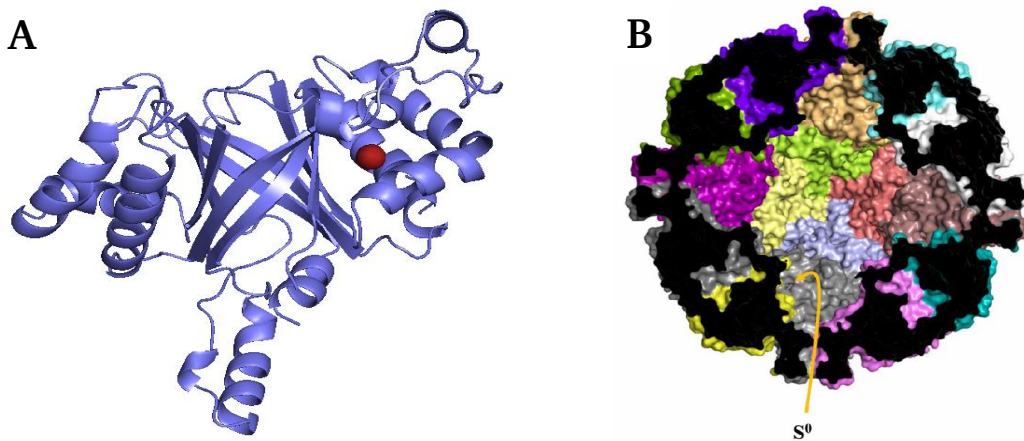
**Abbildung 8:** Oberflächendarstellung von *AaSOR*-Untereinheiten und des Holoenzym. (A) Monomer, (B) Dimer, (C) Holoenzym mit Darstellung einzelner Untereinheiten (Veith, 2011a).

Die SOR aus *Ac. ambivalens* stellt die am besten charakterisierte SOR mit verfügbarer Kristallstruktur dar (Urich *et al.*, 2005b; 2006, PDB Accession: 2CB2). Daneben wurde bislang nur die Kristallstruktur der SOR aus *Ac. tengchongensis* veröffentlicht (Li *et al.*, 2008). In einer vorangegangenen Dissertation (Veith, 2011a) gelang es, durch Röntgenstrukturanalysen ein vorläufiges Strukturmodell der SOR des mesophilen Bakteriums *Halothiobacillus neapolitanus* (*HnSOR*) mit einer Auflösung von 2,9 Å zu erstellen. Erste Vergleiche zeigten, dass beide Enzyme eine sehr ähnliche Proteinarchitektur aufweisen (Abb. 9). Dennoch existieren einige strukturelle Unterschiede zwischen beiden Enzymen, die in Kapitel 7 näher beschrieben werden.



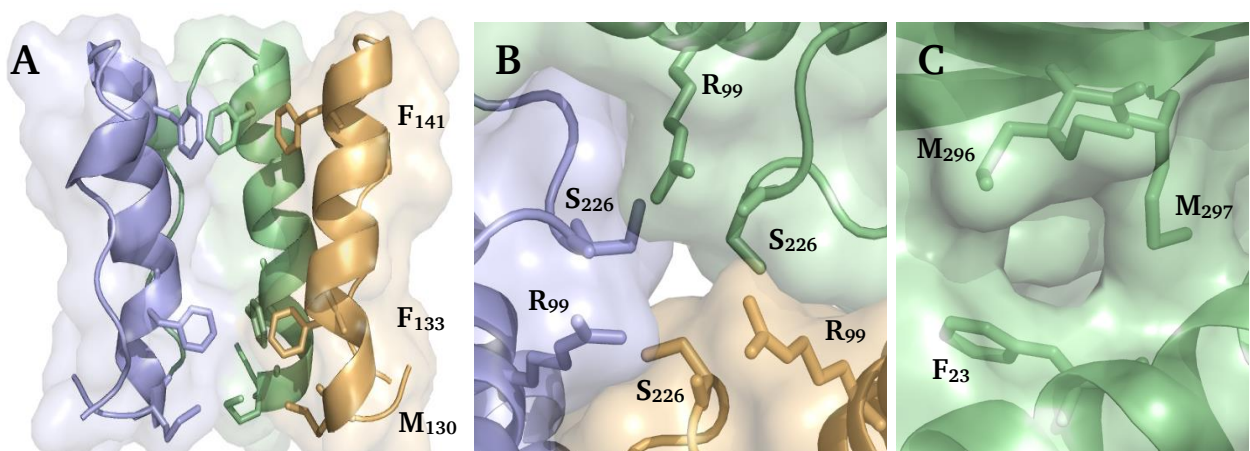
**Abbildung 9:** Oberflächendarstellungen des vorläufigen *HnSOR*-Strukturmodells (A) und des *AaSOR*-Holoenzym (B). (C) Überlagerung der Monomere von *HnSOR* (orange) und *AaSOR* (blau) (Veith, 2011a).

Die Basis einer jeden Untereinheit bildet ein zentrales  $\beta$ -barrel, das von  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Darüber hinaus umfasst jede Untereinheit ein Eisenatom im aktiven Zentrum. Die zentrale innere Kavität ist durch sechs schornsteinähnliche Strukturen an den Vierfachsymmetrieachsen zugänglich, die aus vier Untereinheiten gebildet werden (Abb. 10).



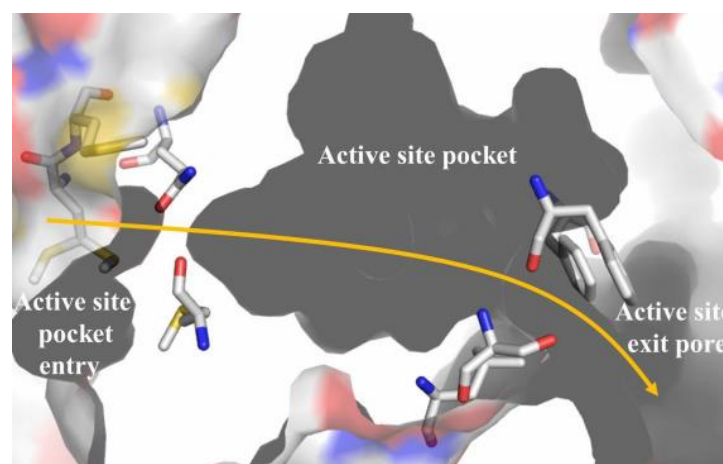
**Abbildung 10:** (A) *Cartoon*-Darstellungen einer Untereinheit der AaSOR mit Eisenatom im aktiven Zentrum. (B) Querschnitt durch das Holoenzym. Die Aufnahme des elementaren Schwefels durch einen Tetramerkanal in die zentrale innere Kavität ist mit einem Pfeil markiert (Veith, 2011).

Die innere Oberfläche dieser Tetramerkkanäle ist mit den Seitenketten hydrophober Aminosäuren ausgekleidet, darunter zwei Ringe aus je vier Phenylalaninseitenketten (F<sub>133</sub>, F<sub>141</sub>) und einem inneren Methioninring (M<sub>130</sub>), die den Durchmesser der Eingangspore auf 5 Å limitieren (bezogen auf C-C-Abstände; Abb. 11 A). Dadurch wird der Zugang zur inneren Kavität auf lineare Schwefelspezies beschränkt (Urich *et al.*, 2006; Veith, 2011a). Mutanten mit teilweiser oder vollständiger Deletion des Tetramerkkanals wiesen einen starken Anstieg der Enzymaktivität auf, weshalb die Tetramerkkanäle vermutlich die Aufnahmespezifität bezüglich des Substrats erhöhen. Die Drosselung der Aktivität könnte zudem bedeuten, dass Reaktionsprodukte nicht unkontrolliert ins Cytoplasma entlassen werden, sondern direkt an weiterprozessierende Oxidoreduktasen weitergeleitet werden (Veith, 2011a). Dies würde wiederum mit der bei *Ac. tengchongensis* beobachteten Membranassoziation der AtSOR korrelieren (Chen *et al.*, 2005).



**Abbildung 11:** Kanäle und Porenöffnungen der AaSOR. (A) Seitliche Ansicht des Tetramerkkanals mit drei sichtbaren Untereinheiten. Dargestellt sind beide Phenylalaninringe (F<sub>133</sub>, F<sub>141</sub>) und der Methioninring (M<sub>130</sub>). (B) Trimerkanal mit den hydrophilen Seitenketten von R<sub>99</sub> und S<sub>226</sub>. (C) Hydrophobe Porenöffnung zum aktiven Zentrum mit F<sub>23</sub>, M<sub>296</sub> und M<sub>297</sub>.

Neben den apolaren Tetramerkkanälen existiert ein zweiter Porentyp in der äußeren Hülle der SOR, der in direkter Verbindung mit der inneren Kavität steht. Die polaren Poren sind an den Dreifachsymmetrieachsen lokalisiert und werden von drei Untereinheiten gebildet (Abb. 11 B). Diese Trimerkanäle sind bei der AaSOR mit hydrophilen Serin- und Argininseitenketten (R<sub>99</sub> und S<sub>226</sub>) ausgekleidet und besitzen einen Durchmesser von 4 Å (Veith, 2011a). Sie stellen putative Produktausgänge der SOR dar (Li *et al.*, 2008; Veith, 2011a). Die aktiven Zentren der Untereinheiten sind über Poren direkt mit der inneren Kavität verbunden und so für das Substrat zugänglich (Abb. 11 C). Die Poren werden von den hydrophoben Resten F<sub>23</sub>, M<sub>296</sub> und M<sub>297</sub> gebildet (Veith, 2011a; Urich *et al.*, 2006). Sie stellen in der AaSOR vermutlich gleichzeitig Substrateingang und Produktausgang der aktiven Tasche dar. In der AtSOR wurde darüber hinaus eine zweite Pore zum aktiven Zentrum nachgewiesen, die sich in der Nähe des Trimerkanals befindet (Li *et al.*, 2008). Auch im vorläufigen Strukturmodell der HnSOR war eine solche Ausgangspore sichtbar, über die möglicherweise die Reaktionsprodukte die aktive Tasche verlassen und über den nahegelegenen Trimerkanal aus dem Enzym gelangen (Abb. 12; Veith *et al.*, 2011b).



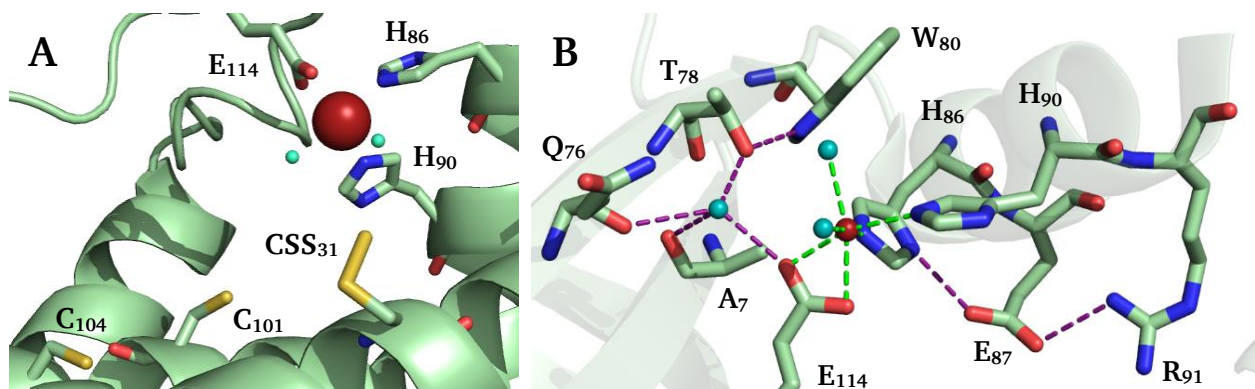
**Abbildung 12:** Oberflächendarstellung der aktiven Tasche der HnSOR mit zugehöriger Eingangs- und Ausgangspore. Der gesamte Weg, beginnend mit der Substrataufnahme in das aktive Zentrum durch die Eingangspore bis zur Abgabe der Produkte durch die Ausgangspore, ist als gelber Pfeil dargestellt (Veith, 2011a).

### 2.5.3. Das aktive Zentrum der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase

Das aktive Zentrum der SOR befindet sich in einer geräumigen Tasche (18 x 18 x 6 Å) im Inneren einer jeden Untereinheit und ist über eine Pore von der inneren Kavität aus zugänglich (Urich *et al.*, 2006; Abb. 11 C). Die katalytischen Zentren sind so räumlich voneinander separiert. Die minimale Distanz der mononukleären Eisenatome zueinander beträgt 38 Å, weshalb eine direkte Interaktion nicht zu erwarten ist (Kletzin, 2008). Die Koordination der Eisenatome erfolgt durch die faciale 2-His-1-Carboxylat-Triade, einem weitverbreiteten Strukturmotiv in Nicht-Häm-Eisen-Enzymen, insbesondere bei Oxygenasen (Bruijninx *et al.*, 2008). Das mononukleäre



Eisen(II)atom wird dabei durch zwei Histidine und ein Glutamat als zweizähniger Ligand koordiniert. Die Komplettierung der oktaedrischen Koordinationssphäre erfolgt durch zwei Wasserliganden (Urlich *et al.*, 2005c; Abb. 13 A). Die Substitutionen der Eisenliganden gegen Alanin bewirkten eine Reduktion des Eiseneinbaus auf unter 1 % und eine damit verbundene, starke Abnahme der Enzymaktivität (Urlich *et al.*, 2005b). Neben der facialen 2-His-1-Carboxylat-Triade besitzen alle bekannten SOR-Spezies drei hochkonservierte Cysteine im aktiven Zentrum (Urlich *et al.*, 2005b; Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009, Abb. 13 A). Durch ortsspezifische Mutagenese wurde gezeigt, dass eines dieser Cysteine (C<sub>31</sub> in AaSOR und AtSOR) essentiell für die Enzymaktivität ist. Die beiden übrigen Cysteine (C<sub>101</sub>, C<sub>104</sub> in AaSOR und AtSOR) sind auf einer Helix im C-X-X-C-Sequenzmotiv angeordnet und ragen ins Lumen des aktiven Zentrums. Einzelmutationen und Doppelmutationen der beiden Cysteine haben zwar eine deutliche Verminderung der Enzymaktivität zur Folge, sie sind jedoch nicht essentiell für die Katalyse (Urlich *et al.*, 2005b; Chen *et al.*, 2009). Bei Röntgenstrukturanalysen der kristallisierten AaSOR wurde eine zusätzliche Elektronendichte am Schwefelatom von C<sub>31</sub> detektiert, was auf eine Persulfurierung dieser Aminosäure (R-S-S-H) hindeutet (Urlich *et al.*, 2005a; 2006). Zudem wurde gezeigt, dass es sich um eine hitzeinduzierte Autosulfurierung des Cysteins handelt. Analog hierzu wurde in der HnSOR eine Persulfurierung von C<sub>33</sub> auch ohne Hitzeaktivierung beobachtet (Veith, 2011a). Aus diesen Beobachtungen und dem Nachweis der essentiellen Funktion wurde geschlussfolgert, dass C<sub>31</sub> höchstwahrscheinlich die Substratbindestelle im aktiven Zentrum der AaSOR darstellt, während die übrigen Cysteine vermutlich eine Rolle in der korrekten Orientierung des Schwefelsubstrats in der aktiven Tasche übernehmen (Urlich *et al.*, 2005c; 2006).



**Abbildung 13:** (A) Aktives Zentrum der AaSOR mit mononukleärem nicht-Häm Eisenatom (rote Kugel), den zugehörigen Eisenliganden (H<sub>86</sub>, H<sub>90</sub>, E<sub>114</sub>), den beiden Wassermolekülen der Koordinationssphäre (Kugeln in Cyan), sowie den drei konservierten Cysteinresten (CSS<sub>31</sub>, C<sub>101</sub>, C<sub>104</sub>). (B) Putatives Wasserstoffbrückennetzwerk (lila gestrichelte Linien) und Koordinationssphäre des Eisenatoms im aktiven Zentrum der AaSOR (grün gestrichelte Linien).

ESR-Spektroskopie zeigte, dass es sich bei dem Eisenzentrum der SOR um ein *high-spin*-Eisen(III)-Zentrum handelt, das durch Inkubation mit elementarem Schwefel bei hohen Temperaturen zu



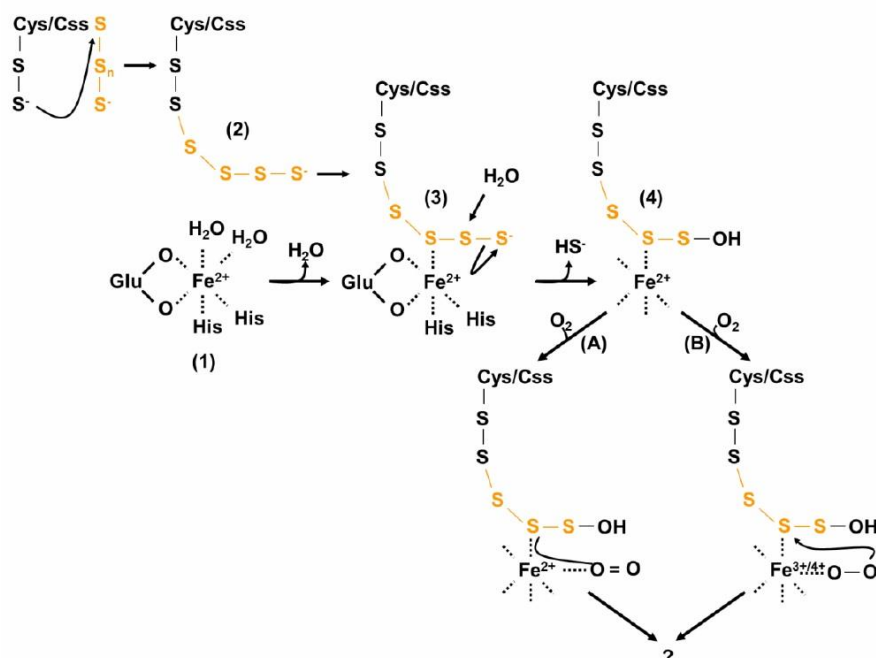
$\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird. Es besitzt ein ungewöhnlich niedriges Redoxpotential von  $E_0' = -268 \text{ mV}$ , was damit rund 300 mV unter dem von anderen Nicht-Häm-Eisen-Enzymen liegt (Kletzin, 2008; Urich, 2005c). Das Redoxpotential ist niedrig genug, um die Bildung von Schwefelwasserstoff durch eine Reduktaseaktivität der SOR zu erklären ( $E_0' = -270 \text{ mV}$  für  $\text{H}_2\text{S}/\text{S}_0$ ; Thauer *et al.*, 1977). Die Erniedrigung des Redoxpotentials könnte das Resultat von Wasserstoffbrückeninteraktionen im näheren Umfeld des Eisenzentrums sein (Abb. 13 B). Der Einfluss solcher Wasserstoffbrückenbindungen auf die Enzymaktivität und das Redoxpotential wurde bereits durch Mutationen in der sekundären Koordinationssphäre am Beispiel der Lipoxygenase der Sojabohne und der Superoxiddismutase von *E. coli* demonstriert (Miller, 2007; Schenk, 2003). Die sekundäre Koordinationssphäre der AaSOR wird durch die Aminosäure  $\text{E}_{87}$  gebildet. Sie ist bei allen SOR-Spezies konserviert. Durch Wasserstoffbrückenbindungen nimmt sie direkt Einfluss auf den Eisenliganden  $\text{H}_{86}$ .  $\text{E}_{87}$  steht wiederum durch eine Wasserstoffbrückenbindung in Kontakt mit  $\text{R}_{91}$ . Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Wasserstoffbrückenbindungen  $\text{H}_{86}\text{-E}_{87}$  und  $\text{E}_{87}\text{-R}_{91}$  eine entscheidende Rolle für die Aktivität der AaSOR spielen. Die Redoxpotentiale der entsprechenden Mutanten sind bislang nicht verfügbar (Veith, 2011a). Auch das Eisenzentrum im Strukturmodell der HnSOR besitzt eine sekundäre Koordinationssphäre. Sie wird jedoch nicht wie bei der AaSOR von einem Glutamat, sondern durch eine Tyrosin-Seitenkette gebildet (siehe Kapitel 7). Das putative Wasserstoffbrückennetzwerk der AaSOR weitet sich auch auf die andere Seite des Eisenzentrums aus. Hier befindet sich  $\text{T}_{78}$  in potentieller Wasserstoffbrückendistanz zu einem Wassermolekül, das sich wiederum in der Lage befindet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Sauerstoffatom der Carboxylgruppe von  $\text{E}_{114}$  auszubilden und somit Einfluss auf die primäre Koordinationssphäre zu nehmen. Aufgrund bisheriger Ergebnisse aus Mutationsanalysen ist davon auszugehen, dass Substitutionen von  $\text{T}_{78}$  Einfluss auf die Enzymaktivität nehmen (Seyfarth, 2006; Veith, 2011a).

#### 2.5.4. Der Reaktionsmechanismus der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase

Aufgrund der essentiellen Funktion von  $\text{C}_{31}$  und der beobachteten Persulfurierung stellt diese Aminosäure höchstwahrscheinlich die Substratbindestelle im aktiven Zentrum dar. Lineare Schwefelspezies könnten kovalent an das persulfurierte  $\text{C}_{31}$  ( $\text{CSS}_{31}$ ) binden und so gegenüber dem Eisenzentrum ausgerichtet werden, wobei das entstandene Polysulfid ( $\text{R-S}_n\text{-S}^\cdot$ ) das eigentliche Substrat darstellt (Urich *et al.*, 2004; 2006; Kletzin 2008). In einem hypothetischen Modell, das versucht, die Disproportionierungs- und Oxidationsreaktion des Enzyms mechanistisch zu erklären, startet die SOR-Reaktion mit einer hydrolytischen Abspaltung von Hydrogensulfid von der gebundenen Schwefelkette, woraus ein hochreaktives Sulfensäure-Intermediat ( $\text{R-S}_n\text{-SOH}$ ) entsteht (Abb. 14). Der weitere Ablauf des Reaktionsmechanismus ist rein spekulativ. In

mononukleären Nicht-Häm-Eisen-Enzymen existieren prinzipiell zwei mögliche Wege der Sauerstoffaktivierung. Zum einen kann die Sauerstoffaktivierung durch das Eisenzentrum vermittelt werden, das zur Sauerstoffbindung im reduzierten Zustand ( $\text{Fe}^{2+}$ ) vorliegen muss ( $\text{Fe}^{3+}$  kann  $\text{O}_2$  nicht aktivieren (Costas *et al.*, 2004)), oder zum anderen durch das Substrat selbst, dass zuvor durch das Metallzentrum aktiviert wurde (Pau *et al.*, 2007). Als Folge dessen wäre in beiden Fällen ein Wechsel des Redoxzustands des Eisenatoms zu erwarten. Für Eisen- und Mangan-abhängige Extradiol-Dioxygenasen wurde jedoch gezeigt, dass eine Sauerstoffaktivierung auch ohne Wechsel des Redoxzustands im Metallzentrum stattfinden kann. Hierbei erfolgt eine Elektronenübertragung vom Substrat auf Sauerstoff, die beide an das Metallzentrum gebunden sind, ohne dass sich der Redoxstatus des Metallzentrums ändert (Emerson *et al.*, 2008).

Durch die Aktivierung würde  $\text{O}_2$  zu einem Peroxid reduziert, einem starken Oxidationsmittel, das die Schwefelkette angreifen und so Sulfit freisetzen könnte (Kletzin, 2008). Die Disproportionierungsreaktion hingegen erfordert ein starkes Nukleophil wie  $\text{OH}^-$ -Ionen und benötigt nicht die Anwesenheit von  $\text{O}_2$ . Das geordnete Wassermolekül im Wasserstoffbrückennetzwerk, das über Wasserstoffbrücken in Verbindung mit  $\text{T}_{78}$  und  $\text{E}_{114}$  steht, wäre ein geeigneter Kandidat für diese Reaktion. Die SOR müsste demzufolge nicht zwangsläufig eine reine Dioxygenase darstellen, sondern eher eine Monooxygenase, was sich mit früheren Beobachtungen an der SOR von *A. brierleyi* deckt (Tab. 1), bei der lediglich ein moderater Einbau von  $^{18}\text{O}$  aus  $^{18}\text{O}_2$  in Sulfit nachgewiesen wurde (Emmel *et al.*, 1986; Kletzin, 2008).



**Abbildung 14:** Hypothetischer Reaktionsmechanismus der SOR mit beiden möglichen Wegen der Sauerstoffaktivierung (Veith, 2011a).

**Tabelle 1:** Übersicht über bereits charakterisierte Schwefel-Oxygenasen/-Reduktasen. Dargestellt sind die Reaktionsparameter und Charakteristiken der verschiedenen SORs und die physiologischen Eigenschaften der zugehörigen Mikroorganismen (Rühl, 2015).

			<i>Bacteria</i>			<i>Archaea</i>		
Spezies			<i>Aquifex aeolicus</i>	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	<i>Thioalkalivibrio thiocyanoxidans</i>	<i>Acidianus ambivalens</i>	<i>Acidianus tengchongensis</i>	<i>Acidianus brierleyi</i>
Proteinquelle			rekombinant	rekombinant	rekombinant	nativ / rekombinant	rekombinant	nativ
Temperatur	T <sub>Opt</sub>	Organismus	85° C	30° C	≈ 30° C	80° C	70° C	65 – 75° C
		Enzym	80° C	80° C	80° C	85° C	70° C	65° C
	Temperaturbereich	Enzym	20 – 90° C	10 – 99° C	10 – 98° C	50 – 108° C	50 – 90° C	55 – ≥ 80° C
	Spezifische Aktivität bei T <sub>Opt</sub>	Oxygenase	78,8 U/mg	42,1 U/mg	208 U/mg	10,6 U/mg	186,7 U/mg	0,9 U/mg
		Reduktase	3,05 U/mg	4,1 U/mg	≤ 0,03 U/mg	2,6 U/mg	45,2 U/mg	k.A. <sup>1</sup>
pH	pH <sub>Opt</sub>	Organismus	6,8	6,5 – 6,9	10	2,5	2,5	1,5 – 2,0
		Enzym	k.A. <sup>1</sup>	8,4	9	6,5 – 7,4	5	7,0
	pH-Bereich	Enzym	5,5 – 8	5,4 – 11	6 – 11,5	5 – 8,4	3,5 – 9	k.A. <sup>1</sup>
M <sub>r</sub>	Untereinheit		37 674	35 300	35 187	35 318	35 172	35 000 <sup>2</sup>
	Holoenzym (Methode)		602 000 (natives Gel)	848 000 (DLS <sup>3</sup> )	556 400 (Gelfiltration)	844 000 (X-ray cryst. <sup>4</sup> )	845 000 (X-ray cryst. <sup>4</sup> )	560 000 (natives Gel)
Sequenzidentität mit der AaSOR			36 %	40 %	32 %	100 %	88 %	n.b. <sup>5</sup>
Referenzen			Pelletier <i>et al.</i> , 2008	Veith <i>et al.</i> , 2012	Rühl, 2015	Kletzín, 1989; Urich <i>et al.</i> , 2004; 2006	Sun <i>et al.</i> , 2003 Chen <i>et al.</i> , 2005; Li <i>et al.</i> , 2008;	Emmel <i>et al.</i> , 1986

<sup>1</sup> k.A., keine Angabe

<sup>2</sup> apparente molekulare Masse mittels SDS-PAGE bestimmt, das Gen ist nicht bekannt

<sup>3</sup> DLS, *differential light scattering* (dynamische Lichtstreuung)

<sup>4</sup> X-ray cryst., *X-ray crystallography* (Röntgenkristallographie)

<sup>5</sup> n.b., Sequenz nicht bekannt

---

### 2.5.5. Schwefel-Oxygenasen/-Reduktasen verschiedener Mikroorganismen

SORs und *sor*-Gene sind in der Natur nicht sehr weit verbreitet. Durch Analysen und Vergleiche bekannter SOR-Aminosäuresequenzen wurde ein phylogenetischer Stammbaum dieser Sequenzen erstellt (Abb. 15). Hierbei waren sowohl Sequenzen in *Archaea* als auch *Bacteria* gefunden worden, die aus unterschiedlichsten Habitaten stammen. Die Eigenschaften einiger bereits charakterisierter SORs und der zugehörigen Mikroorganismen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Bereits 1986 wurde ein schwefeloxidierendes Enzym aus dem thermoacidophilen Archaeon *Acidianus brierleyi* (früher *Sulfolobus brierleyi*) isoliert und als Schwefeloxxygenase charakterisiert, die elementaren Schwefel zu Sulfit oxidiert (Emmel *et al.*, 1986). Eine Reduktaseaktivität wurde nicht beschrieben, doch aufgrund der ähnlichen Eigenschaften zu bereits charakterisierten SORs von *Ac. ambivalens* (AaSOR) und *Ac. tengchongensis* (AtSOR) handelt es sich bei der postulierten Schwefeloxxygenase vermutlich auch um eine SOR (Tab. 1, Kletzin, 1994). Die meisten archaealen SOR-Sequenzen wurden in thermophilen oder hyperthermophilen Organismen gefunden, darunter auch die SORs von *Ac. ambivalens* und *Ac. tengchongensis*. Sie sind die am besten charakterisierten SORs. Zudem existieren für beide Enzyme Kristallstrukturen. Das Temperaturspektrum der AaSOR erstreckt sich von 50 - 108 °C mit einem Temperaturoptimum von 85 °C. Einen ähnlichen Temperaturbereich deckt die AtSOR ab, deren Aminosäuresequenz zu 88 % mit der der AaSOR übereinstimmt. Sie ist von 50 - 90 °C aktiv mit einem etwas niedrigeren Temperaturoptimum von 70 °C. Während das pH-Optimum der AaSOR im neutralen Bereich bei etwa 7 liegt, wurde die höchste Aktivität der AtSOR im leicht sauren Bereich bei pH 5 gemessen (Urich *et al.*, 2004; 2006; Sun *et al.*, 2003 Chen *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008).

Die Verbreitung der SOR ist dabei nicht auf thermophile *Archaea* limitiert. Inzwischen wurden SORs und *sor*-Gene auch bei diversen Bakterien nachgewiesen, darunter hauptsächlich mesophile und moderat thermophile Vertreter. Die erste biochemische Charakterisierung einer bakteriellen SOR erfolgte für das Enzym des hyperthermophilen *Aquifex aeolicus* (AqSOR), wobei die enzymatischen Eigenschaften den *Archaea*-SORs aus *Ac. ambivalens* und *Ac. tengchongensis* ähnelten (Pelletier *et al.*, 2008). Das Temperaturoptimum liegt bei 80 °C mit einem optimalen pH-Wert von 6,8. Der Aktivitätsbereich erstreckt sich von 20 - 99 °C (Pelletier *et al.*, 2008). Trotz identischem Reaktionstyp und ähnlichen Reaktionsparametern beträgt die Sequenzidentität zur AaSOR lediglich 36 %. Die AqSOR enthält zudem zwei Sequenzinsertionen. Die erste umfasst 13 Aminosäuren, befindet sich an der Position des  $\beta$ -Strangs B3 der AaSOR und ersetzt diesen. Die zweite Insertion umfasst 7 Aminosäuren und ist im C-terminalen Bereich lokalisiert.

A. Veith charakterisierte erstmals die SOR eines mesophilen Bakteriums, *Halothiobacillus neapolitanus*, strukturell und biochemisch (siehe Kap. 7). Die Identität der Aminosäuresequenz zur AaSOR beträgt 40 %. Interessanterweise liegt das Temperaturoptimum der HnSOR bei 80 °C,

---

obwohl *H. neapolitanus* als mesophiler Mikroorganismus eine optimale Wachstumstemperatur von 30 °C präferiert. Der Aktivitätsbereich der *HnSOR* erstreckt sich von 10 - 99 °C mit einem optimalen pH-Wert von 8,4 (Veith, 2011a; 2011b).

Die größte Distanz im phylogenetischen Stammbaum (Abb. 15) der SORs besteht zwischen der SOR aus *Ac. ambivalens* und der am tiefsten abzweigenden SOR aus *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* mit einer Sequenzidentität von 31,6 %. Das aus Sodaseen isolierte alkaliphile und halophile  $\gamma$ -Proteobakterium wächst optimal bei einem pH-Wert von 10 und einer Salzkonzentration im Bereich von 0,3 bis 1 M Na<sup>+</sup> (Sorokin *et al.*, 2002; 2014). Das Temperaturoptimum der heterolog produzierten *TtSOR* ähnelte denen der bereits beschriebenen SOR-Spezies und betrug 80 °C bei einem optimalen pH-Wert von 9. Wie auch bei der *HnSOR* wurde eine Aktivität im Temperaturbereich von 10 - 98 °C festgestellt. Interessanterweise wurde, im Gegensatz zu allen anderen bisher charakterisierten SORs, nur eine äußerst schwer nachweisbare Reduktaseaktivität beobachtet, weshalb die *TtSOR* eine besondere Stellung innerhalb der bislang charakterisierten SORs einnimmt (Rühl, 2015).

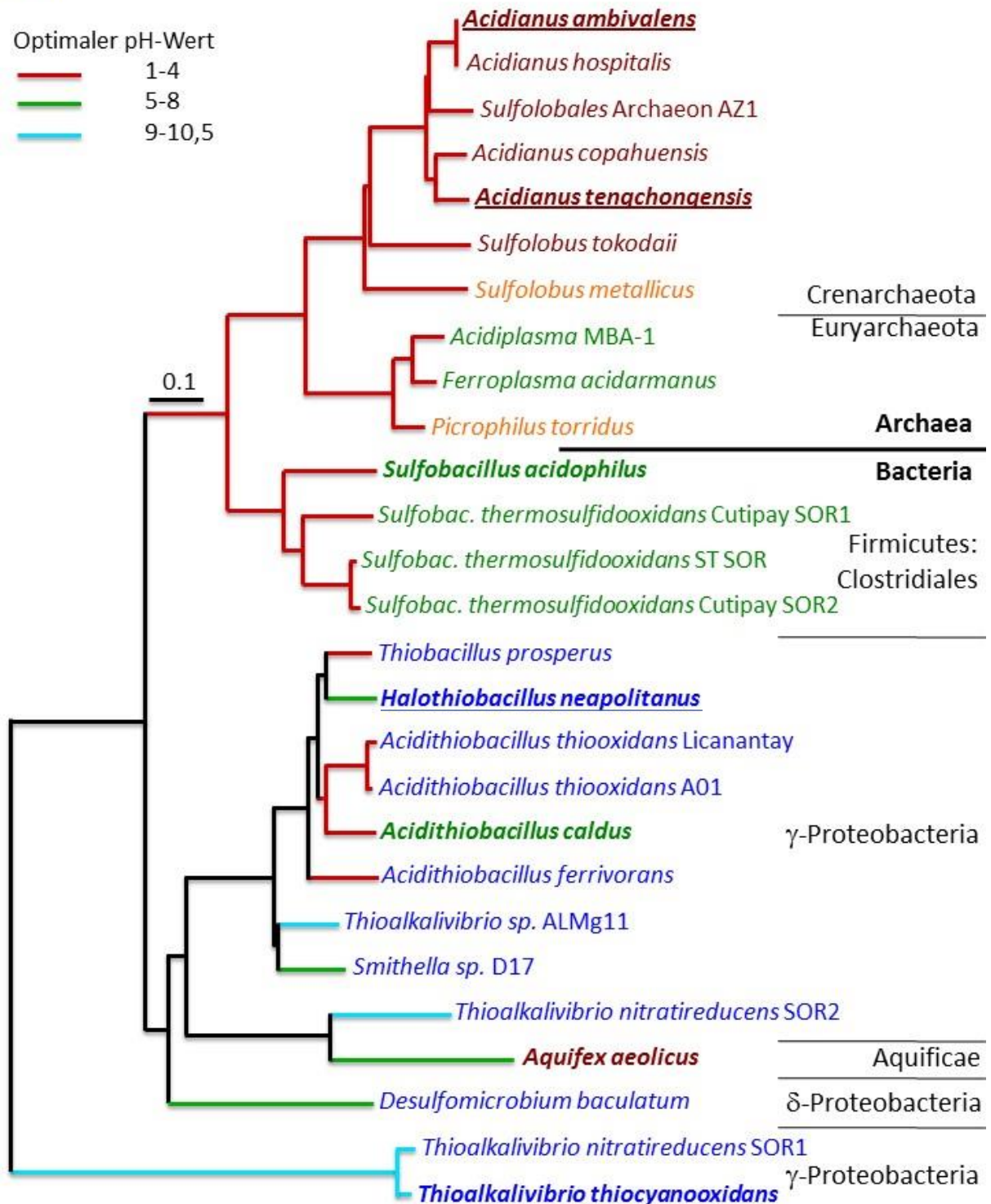
Daneben wurden SORs und *sor*-Gene bei weiteren Bakterien nachgewiesen, darunter *Acidithiobacillus* sp. strain SM-1 (Chen *et al.*, 2007), *Ab. caldus* (Mangold *et al.*, 2011), *Ab. caldus*-ähnliche Stämme (Janosch *et al.*, 2009) und *Sulfobacillus acidophilus* TPY (Zhang *et al.*, 2013). Neue Untersuchungen ergaben, dass die damals für *Ab. caldus* strain S1 und S2 nachgewiesene SOR-Aktivität (Janosch *et al.*, 2009) lediglich auf einer Kontamination mit *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* zurückzuführen ist (Janosch *et al.*, 2015).

# Optimale Wachstumstemperatur

Rot	≥70°C
Orange	51-69°C
Grün	40-50°C
Blau	≤ 37°C

## Optimaler pH-Wert

—	1-4
—	5-8
—	9-10,5



**Abbildung 15:** Phylogenetischer Stammbaum bekannter SOR-Sequenzen (aus Genbank). Die Farbcodierung beschreibt die optimalen Wachstumsbedingungen aller dargestellten Organismen. **Fettschrift:** Enzym nativ isoliert und/oder rekombinant in *E. coli* produziert und gereinigt. Unterstrichen: Kristallstruktur verfügbar (Stammbaum erstellt von Arnulf Kletzin, TU Darmstadt)



---

## 3. Material und Methoden

---

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
2-Propanol	LS Labor Service GmbH, Griesheim
10 x DNA-Probenauftragspuffer	Fermentas, Heidelberg
Acrylamidlösung (30:0.8)	Roth, Karlsruhe
Agarose Biozym ME	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Ammoniumacetat	LS Labor Service GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfid	Avantor Performance Mat., Center Valley, USA
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Anhydrotetrazyklin (AHT)	IBA, Göttingen
Bacto-Agar	Difco/Nordwald, New York, USA
Bis(methylthiomethyl)-sulfid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Citronensäure	LS Labor Service GmbH, Darmstadt
Chelex 100	BioRad, Hercules, USA
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe,
Cobalt(II)-nitrat (5N)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Roti-Blue, colloidal	Roth, Karlsruhe
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
Desoxynukleotide (dNTPs)	Roth, Karlsruhe
Diallyltrisulfid	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
Diethylsulfid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethyldisulfid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethyltrisulfid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethyltrithiocarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Di- <i>tert</i> -butyl-Polysulfid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisen-(III)-Chlorid	Roth, Karlsruhe
Eisen-(II)-Sulfat	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	LS Labor Service GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %) (Formalin)	LS Labor Service GmbH, Darmstadt
Fuchsin	Merck, Darmstadt
Gallium, elementar (7N)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt, granuliert	Roth, Karlsruhe
Hydroxy-Azophenyl Benzoessäure (HABA)	Acros Organics, Geel, Belgien
Knoblauchöl, artifiziell	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-acetat (5N)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumsulfit	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethyl-p-phenyldiamin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Nickel(II)-nitrat (5N5)	Roth, Karlsruhe
Pepton	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Salzsäure 37%, ROTIPURAN (Art.-Nr. 4625.2)	Roth, Karlsruhe
Silicon-Antischaum	Roth, Karlsruhe
<i>Strep-Tactin Gravityflow</i> -Säule (1 ml)	IBA, Göttingen
<i>Strep-Tactin Superflow</i> -Säule (5 ml)	IBA, Göttingen
Schwefel, elementar	AppliChem, Darmstadt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
2,4,6-Tripyridyl-1,3,5-Triazin (TPTZ)	Acros Organics, Geel, Belgien
Trichloressigsäure (TCA)	IBA, Göttingen
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tyrpton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Zinkacetat	Merck KGaA, Darmstadt

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien stammten von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), LS Labor-Service GmbH (Griesheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München).

### 3.1.2. Mikroorganismen

<i>Escherichia coli</i> TOP10 <sup>+</sup>	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	Stratagene(AgilentTechnologies), Waldbronn

### 3.1.3. Plasmide

pASK-sor.05	Urich <i>et al.</i> , 2004
pASK_HnSOR	Veith <i>et al.</i> , 2011
pASK-AaSOR-Y102A	Teil dieser Arbeit
pASK-AaSOR-Y102G	“
pASK-AaSOR-Y102S	“
pASK-AaSOR-Y102W	“
pASK-HnSOR-L107A	“
pASK-HnSOR-S104A	“
pASK-HnSOR-S104M	“
pASK-AaSOR-I116Y	“
pASK-AaSOR-E87A	“
pASK-AaSOR-E87D	“
pASK-AaSOR-I47W	“
pASK-HnSOR-E89A	“
pASK-HnSOR-E89D	“
pASK-HnSOR-Q47A	“
pASK-HnSOR-Y118I	“



### 3.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Alle in Tabelle 2 aufgeführten synthetischen Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

**Tabelle 2:** Synthetische Oligonukleotide. Gegenüber der Wildtypsequenz substituierte Nukleotide sind durch kleingedruckte Buchstaben gekennzeichnet. Eingefügte diagnostische Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Fettgedruckte Buchstaben zeigen das substituierte Triplet für den gewünschten Aminosäureaustausch an.

Name	Oligonukleotid-Sequenz	Restriktions-schnittstelle
Aa Y <sub>102</sub> A fwd	5'-TTCAGGCTAT <u>TCgca</u> TCATGCGCTTCACAAATG-3'	<i>FspI</i>
Aa Y <sub>102</sub> A rev	5'-CATTTGTGAAGCGCATGAT <u>tgCGCA</u> TAGCCTGAA-3'	
Aa Y <sub>102</sub> S fwd	5'-TTCAGGCTATGC <b>ag</b> TTTCATGCGCaTCACAAATG-3'	<i>FspI</i>
Aa Y <sub>102</sub> S rev	5'-CATTTGTGAT <u>GCGCAT</u> GAA <b>Act</b> GCATAGCCTGAA-3'	
Aa Y <sub>102</sub> W fwd	5'-TTCAGGCTATGCT <b>gg</b> TCATGCGCaTCACAAATG-3'	<i>FspI</i>
Aa Y <sub>102</sub> W rev	5'-CATTTGTGAT <u>GCGCAT</u> GAA <b>cc</b> AGCATAGCCTGAA-3'	
Aa Y <sub>102</sub> G fwd	5'- <b>gga</b> TCATGCGCTTCACAAATG-3'	<i>AlwI</i>
Aa Y <sub>102</sub> G rev	5'-GCATAGCCTGAATAAGTAACTCCA-3'	-
Aa I <sub>47</sub> W fwd	5'- <b>tgg</b> CAAATAGGAATTcTGCCA-3'	<i>EcoRI</i>
Aa I <sub>47</sub> W rev	5'-ATGGTTTTGAACCAACAAAGCC-3'	-
Aa I <sub>116</sub> Y fwd	5'- <b>ta</b> TTATGAAATAATCTACGCAAACATGCCTATAAAC-3'	-
Aa I <sub>116</sub> Y rev	5'-TGGCTCCCATGGTCCCATAT-3'	<i>NcoI</i>
Hn Y <sub>118</sub> I fwd	5'- <b>at</b> TTTTGAGGTGGTCAAGTCgGATCTGCCC-3'	<i>PsuI</i>
Hn Y <sub>118</sub> I rev	5'-CGGCTCCCATGGGCCCTCGAT-3'	-
Hn L <sub>107</sub> A fwd	5'- <b>gc</b> TGGCATGGTGATCGAGGGC-3'	-
Hn L <sub>107</sub> A rev	5'-GCAGCCGCTGCACAACTCGAA-3'	<i>AlwNI</i>
Aa E <sub>87</sub> A fwd	5'- <b>Gc</b> AGAAATGCAtAGGCAAAAC-3'	<i>NsiI</i>
Aa E <sub>87</sub> A rev	5'-ATGGTCTTTCCAATCTTTCCA-3'	-
Aa E <sub>87</sub> D fwd	5'- <b>GAt</b> GAAATGCAtAGGCAAAAC-3'	<i>NsiI</i>
Aa E <sub>87</sub> D rev	5'-ATGGTCTTTCCAATCTTTCCA-3'	-
Hn E <sub>89</sub> A fwd	5'- <b>Gc</b> AGAAATGCAtCATGATAATTTC-3'	<i>NsiI</i>
Hn E <sub>89</sub> A rev	5'-ATGAGAATGAACATCTTTCCAGAC-3'	-
Hn E <sub>89</sub> D fwd	5'- <b>GAt</b> GAAATGCAtCATGATAATTTC-3'	<i>NsiI</i>
Hn E <sub>89</sub> D rev	5'-ATGAGAATGAACATCTTTCCAGAC-3'	-
Hn S <sub>104</sub> A/M fwd	5'-aGGCATGGTGATCGAGGGC-3'	<i>BlnI</i>
Hn S <sub>104</sub> A rev	5'-AGGCAACCG <b>gc</b> GCACAACTC-3'	<i>BlnI</i>
Hn S <sub>104</sub> M rev	5'-AGGCAAC <b>Ca</b> TGCACAACTC-3'	<i>BlnI</i>
Hn Q <sub>47</sub> A	5'- <b>gcc</b> TTGTTGCAAACCGGTATA-3'	<i>StuI</i>
Hn Q <sub>47</sub> A	5'-CTCAAAGCCTAAAAACCTGG-3'	-
ask2_rev	5'-GCGTGGAGATCCGTGACGCA-3'	-
ask1b_fwd	5'-AGAGTTATTTTACCACTCCCTATCAG-3'	-

---

### 3.1.5. Enzyme, Kits und Größenstandards

#### Enzyme:

Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich; New England Biolabs GmbH, Frankfurt
T4-DNA-Ligase (400 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
T4-Polynukleotidkinase (5 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
DNaseI (50U/ $\mu$ l, RNase-frei)	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich

#### Kits:

E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I	Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, USA
GenElute PCR Cleanup Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze
BCA Protein Assay-Kit	G-Biosciences, St Louis, USA

#### Größenstandards für DNA:

GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
--------------------------	---

#### Größenstandards für Proteine:

Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich

### 3.1.6. Medien

LB-Medium (pro L dH <sub>2</sub> O):	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	pH 7,2 mit NaOH eingestellt	
	Ampicillin: 100 $\mu$ g/mL	
	Chloramphenicol: 30 $\mu$ g/mL	
	Für Festmedien: 10 g Difco Bacto Agar	
2 x YT-Medium (pro L dH <sub>2</sub> O):	Trypton	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	pH 7,0 mit NaOH eingestellt	
	Ampicillin: 100 $\mu$ g/mL	
	Chloramphenicol: 30 $\mu$ g/mL	

SB-Medium (pro L dH <sub>2</sub> O):	Trypton	32 g
	Hefeextrakt	20 g
	NaCl	5 g
	pH 7,2 mit NaOH eingestellt	
	Ampicillin: 100 µg/mL	
	Chloramphenicol: 30 µg/mL	
SOB-Medium (pro L dH <sub>2</sub> O):	Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,5 g
SOC-Medium (pro Liter dH <sub>2</sub> O):	SOB Medium	100 mL
	1 M MgSO <sub>4</sub>	1 mL
	1 M MgCl <sub>2</sub>	1 mL
	2 M Glucose	1 mL
	Wurden steril zugegeben	

### 3.1.7. Puffer und Lösungen

#### Agarose-Gelelektrophorese:

50 x TAE Puffer (pro Liter dH <sub>2</sub> O):	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	50 mM
10 x DNA Auftragspuffer (pro Liter dH <sub>2</sub> O):	Bromphenolblau	0.25 % [w/v]
	Saccharose	50 % [w/v]
	EDTA pH 8.0	0,1 M

#### Heterologe Genexpression in *E. coli*:

Eisen(II)citrat-Lösung	Citronensäure	100 mM
	Fe <sub>2</sub> Cl	100 mM
Anhydrotetracyclin -Lösung	Anhydrotetracyclin	2 mg/mL
	gelöst in N,N-Dimethylformamid	

#### Proteinisolation und Präparation von *Inclusion bodies*:

Puffer W:	Tris/HCl pH 8,0	100 mM
	NaCl	150 mM
Puffer E:	Tris/HCl pH 8,0	100 mM
	NaCl	150 mM
	Desthiobiotin	2,5 mM
Puffer R:	Tris/HCl pH 8,0	100 mM
	NaCl	150 mM
	HABA	1 mM

Tris-Lösung (ohne pH-Einstellung)	Tris	100 mM
<i>Inclusion body</i> Waschpuffer:	Tris/HCl pH 8,0 Natriumdesoxycholat Harnstoff Glycerin EDTA	100 mM 1% [w/v] 1 M 10% [v/v] 2 mM
<i>Inclusion body</i> Denaturierungspuffer:	Tris/HCl pH 8,0 Harnstoff β-Mercaptoethanol EDTA	50 mM 8 M 2 mM 2 mM
<b>Proteinquantifizierung:</b>		
Bradford-Reagenz (pro Liter dH <sub>2</sub> O): (Bradford, 1976)	Coomassie Brilliant Blue G250 Ethanol (99,6 %) Phosphorsäure (85 %)	0,01 % 4,75 % 8,50 %
<b>Enzymaktivitätstests:</b>		
SOR-Enzymtestpuffer:	Tris/HCl, pH 7,2 Tween 20 Schwefel Der Schwefel wurde dispergiert.	70 mM 0,1 % [v/v] 2 % [w/v] via Ultraschall
Citrat-Phosphat-Testpuffer (pro Liter dH <sub>2</sub> O) pH 7,2 (Veith, 2011a)	Citronensäure (0,1 M) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M) Tween 20 Schwefel Der Schwefel wurde dispergiert.	13,1 mL 86,9 mL 0,1 % [v/v] 2 % [w/v] via Ultraschall
<b>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:</b>		
3 x Schägger-Gelpuffer:	Tris/HCl, pH 8,45 SDS	3 M 0,3 % [w/v]
10 x Anodenpuffer:	Tris/HCl, pH 8,9	2 M
10 x Kathodenpuffer:	Tris/HCl, pH 8,45 Tricin SDS	1 M 1M 1 % [w/v]
3 x Auftragspuffer:	Tris-HCl, pH 8,45 DTT NaEDTA SDS Bromphenolblau Glycerin	150 mM 6 % [w/v] 15 mM 6 % [w/v] 0,2 % [w/v] 15% [v/v]

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. Zielgerichtete Mutagenese

Für die zielgerichtete Mutagenese wurden die Expressionsplasmide pASK-SOR.05 und pASK\_HnSOR als *templates* eingesetzt. Synthetische Oligonukleotide mit einer Länge von 21 - 36 Nukleotiden enthielten neben der eigentlichen Punktmutation eine weitere stille Mutation, die eine Generierung/Entfernung einer diagnostischen Restriktionsschnittstelle für eine spätere Restriktionsanalyse bewirkt (Tab. 2). Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion und die Thermocycler-Bedingungen sind in Tabelle 3 und 4 angegeben. Die primerspezifischen *Annealing*-Temperaturen wurden mit dem auf die Q5 High-Fidelity DNA Polymerase optimierten NEB T<sub>m</sub> Calculator ermittelt ([www.neb.com](http://www.neb.com)).

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Komponenten für die Mutagenese-PCR.

Komponenten	25 $\mu$ l Reaktionsansatz	Endkonzentration
5X Q5 Reaktionspuffer	5 $\mu$ l	1 X
10 mM dNTPs	0,5 $\mu$ l	200 $\mu$ M
10 $\mu$ M <i>Forward</i> Primer	1,25 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
10 $\mu$ M <i>Reverse</i> Primer	1,25 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Template DNA	variabel	1 ng
Q5 DNA Polymerase	0,25 $\mu$ l	0,5 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l	

**Tabelle 4:** PCR-Bedingungen für die Mutagenese-PCR im Thermocycler.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	10 s	30
Primer- <i>Annealing</i>	50–72°C	30 s	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	2 min	1
Kühlung	4°C	-	-

Nach einer Restriktion mit *DpnI* (NEB) für 1 h bei 37 °C wurden die PCR-Produkte mit dem GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach Herstellerangaben gereinigt und mit 50  $\mu$ L Elutionspuffer eluiert. Zur Phosphorylierung wurden den gereinigten PCR-Produkten 1  $\mu$ L T4-Polynukleotidkinase (NEB) und 5,5  $\mu$ L 10X Ligasepuffer (NEB) zugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dem folgte die Ligation der PCR-Produkte durch Zugabe von 1  $\mu$ L T4-DNA Ligase (NEB) und eine Inkubation von 1 h bei 37 °C, 2 h bei RT oder ÜN bei 16 °C.

---

5  $\mu$ L des Ligationsansatz wurden für die Hitzeschocktransformation von kompetenten *E. coli* TOP10<sup>+</sup> Zellen eingesetzt. Mit Einzelkolonien der erzeugten Transformanten wurden je 5 mL LB-Medium inokuliert und bei 37 °C üN schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des E.Z.N.A. Plasmid Mini KIT (Omega Bio-Tek, Norcross, USA) isoliert. Anschließend erfolgte eine Restriktion von 500 ng isolierter Plasmid-DNA in einem 20  $\mu$ L Ansatz mit Restriktionsenzymen, die spezifisch die eingefügte/entfernte diagnostische Schnittstelle erkennen. Die geeigneten Reaktionsbedingungen wurden anhand der Herstellerangaben ausgewählt. Die Ergebnisse der Kontrollrestriktion wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Die Plasmide der AaSOR-Mutanten Y<sub>102A</sub>, Y<sub>102S</sub> und Y<sub>102W</sub> wurden abweichend von der hier beschriebenen Methode nach dem Originalprotokoll der *QuickChange* Mutagenese (Agilent Technologies; Böblingen) durch eine überlappende PCR erzeugt. Nach einer Restriktion mit *DpnI* erfolgte die Hitzeschocktransformation von kompetenten *E. coli* TOP10<sup>+</sup> Zellen.

### 3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung der Gele wurden 1 % [w/v] Agarose in 1 x TAE Puffer gelöst. Als Laufpuffer diente 0,5 x TAE Puffer. Proben und DNA-Größenstandard wurden mit entsprechendem Volumen 10 x DNA Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurden die Gele für 10 min mit Ethidiumbromid-Lösung (1  $\mu$ g/L in ddH<sub>2</sub>O) gefärbt, 10 min in ddH<sub>2</sub>O entfärbt und anschließend unter UV-Licht in einem Geldokumentationssystem ausgewertet.

### 3.2.3. Heterologe Genexpression in *E. coli*

*E. coli* BL 21 Codon plus (DE3) RIL Zellen wurden mit den ursprünglichen Plasmiden pASK-SOR.05, pASK\_*HnSOR* oder Varianten dieser Vektoren, die mittels ortsspezifischer Mutagenese verändert wurden, transformiert. Die Expressionskulturen wurden mit einer Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und die Expression des *sor*-Gens ab einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 1,0 durch die Zugabe von in DMF gelöstem Anhydrotetracyclin (200  $\mu$ g/L Kultur) induziert. Expressionskulturen mit 500 mL Medium wurden schüttelnd (180 - 200 rpm) in Schikanekolben bei 37 °C inkubiert. Die Kultivierung im Fermenter (*Polycarbonate Culture Vessel*, Nalgene, Rochester, USA) mit 15 L Medium wurde unter schnellem Rühren (300 - 350 rpm) und gleichzeitiger Belüftung über zwei Pumpen bei 30 oder 37 °C durchgeführt. Um einen ausreichenden Einbau von Eisen zu gewährleisten, wurden dem Medium zum Induktionszeitpunkt 100  $\mu$ M Eisen(II)citrat-Lösung

---

zugegeben. Abhängig vom Volumen der Kultur wurde zusätzlich eine geringe Menge (50 - 1000  $\mu$ L) Silicon-Antischaum (Roth, Karlsruhe) hinzugefügt, um die Schaumbildung zu verringern. Nach einer Inkubationszeit von 20 h wurden die Zellen geerntet und prozessiert.

### 3.3. Biochemische Methoden

#### 3.3.1. Isolation und Reinigung rekombinanter SOR aus *E. coli*

*E. coli* Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (10.000 x g für 10 min, Sigma 6-16K, 12500-H; SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) und mit zehnfachen Volumina (v/w) Puffer W gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 5 Volumina Puffer W resuspendiert und auf Eis stehend via Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier S250, Heinemann, Schwäbisch Gmünd). Zellen aus 500 mL Kulturen wurden für 5 min konstant auf Stufe 6 mit der Mikrospritze (5 mm), Zellen aus einer 15 L Kultur für 20 min konstant auf Stufe 10 mit der Makrospritze (12 mm) beschallt. Zelltrümmer und *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation (10.000 x g für 20 min, Sigma 6-16K, 12500-H oder 12166-H; SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) pelletiert und der Überstand mit der löslichen Proteinfraction direkt im Anschluss in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (100.000 x g für 45 min, 45 Ti oder 55.2 Ti, Beckman Instruments).

Unmittelbar vor der affinitätschromatographischen Reinigung wurde das Zellextrakt sterilfiltriert (Rotilabo-Spritzenfilter 0,22  $\mu$ m, Roth, Karlsruhe oder Millipore Express PLUS Membranfilter 0,22  $\mu$ m, Merck Millipore, Darmstadt), um kleinere Partikel aus der Lösung zu entfernen. Die Aufreinigung der aus 500 mL Kulturen erhaltenen Proteinlösung erfolgte über 1 mL *Strep*-Tactin *Superflow* Tropfsäulen (IBA GmbH, Göttingen), die aus 15 L Kulturen über zwei gekoppelte 5 mL *Strep*-Tactin *Superflow* Säulen (IBA GmbH, Göttingen) mittels ÄKTApurifier 10 FPLC-System (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) mit einer Flussrate von 2 mL/min. Vor dem Auftragen des Zellextraktes wurden die Säulen mit 5 Säulenvolumen (CV) Puffer W äquilibriert. Nach Applikation der Proteinlösung wurde die Säule mit 6 CV Puffer W gewaschen und gebundenes Protein mit 3 CV Puffer E eluiert. Zur Regeneration der Säulenmatrix wurde diese mit 15 CV Puffer R gespült. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 100 mM Tris-Lösung bis zur Entfärbung des Säulenmaterials gefolgt von einer Reäquilibrierung mit 8 CV Puffer W. Alternativ wurde die Säule zur Reinigung und zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine mit 5 CV 0,5 M NaOH, gefolgt von 8 CV Puffer W regeneriert. Die alternative Regenerierung wurde vor allem für Reinigungen der SOR-Präparationen mit Metallsubstitutionen durchgeführt, um Proteinkontaminationen durch die vorherige Reinigung zu verhindern. Alle für die

---

Chromatographie verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch filtriert (Millipore Express PLUS Membranfilter 0,22  $\mu$ m, Merck Millipore, Darmstadt) und entgast.

### 3.3.2. Präparation von SOR/Inhibitor-Komplexen

Zur Identifikation von Inhibitorbindestellen in der AaSOR durch Röntgenstrukturanalyse wurden SOR-Inhibitor-Komplexe präpariert und anschließend kristallisiert. Zur Präparation der SOR-Inhibitor-Komplexe wurden 5/10 mg rekombinante AaSOR-Wt in 500/1000 mL Citrat-Phosphat-Testpuffer mit definierten Mengen des jeweiligen Inhibitors versetzt (2,5 mM DATS, 10 mM DDS, 1 % DTBPS, 1 % Knoblauchöl). Der Ansatz wurde für 20 - 30 min bei 80 °C inkubiert und nach Abkühlen der unlösliche elementare Schwefel durch Filtration entfernt. Nach einer Ultrazentrifugation (100.000 x g für 45 min, 45 Ti, Beckman Instruments) erfolgte eine *Strep-Tactin* Affinitätschromatographie zur Isolation der inhibierten SOR. Zur Entfernung freier Inhibitoren wurde der Waschschrift nach Proteinbindung auf 12 CV verlängert.

### 3.3.3. Denaturierung und Rückfaltung rekombinanter SOR aus *inclusion bodies*

Bei der Überexpression von rekombinanter SOR in *E. coli* entstehen große Mengen fehlerhaft oder unvollständig gefalteter Proteinaggregate, die als Einschlusskörper in der Zelle vorliegen. Zur Isolation dieser *inclusion bodies* aus *E. coli* wurden die geernteten Zellen aus einer 15 L Kultur wie zuvor beschrieben aufgeschlossen, das Lysat direkt nach der Beschallung mit 1 mg DNase und 1/200 Vol 1 M MgSO<sub>4</sub> versetzt und für 15 - 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer zusammen mit den *inclusion bodies* pelletiert.

Die erhaltenen Pellets wurden in *inclusion body* Waschpuffer resuspendiert, mittels Ultraschall dispergiert (Stufe 9 für 5 min, konstante Beschallung mit Makrospitze, Branson Sonifier S250, Heinemann, Schwäbisch Gmünd), erneut zentrifugiert (10.000 x g für 10 min, Sigma 6-16K, 12500-H; SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz) und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt. Die gewaschenen *inclusion bodies* wurden in 10 Vol *inclusion body* Denaturierungspuffer gelöst und dispergiert. Zur Entfaltung und Solubilisierung der SOR erfolgte eine Inkubation der Suspension bei 60 °C für 1 h. Abschließend wurde das Solubilisat in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (100.000 x g für 10 min, 45 Ti, Beckman Instruments).

Metallaustausch und Rückfaltung der rekombinanten SOR erfolgten in einem mehrstufigen Dialyseprozess. Der Dialyseschlauch (ZelluTrans MWCO 6000 - 8000, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) wurde vor dessen Verwendung zweimal für 10 min in einer Lösung aus 2 % Natriumbicarbonat und 1 mM EDTA gekocht, um enthaltene Spurenelemente zu entfernen. Nach dem Aufkochen wurde der Dialyseschlauch jeweils mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Zur Entfernung von



---

EDTA-Eisen-Komplexen und restlicher EDTA aus der Lösung, erfolgte die erste Dialyse gegen 8 M Harnstoff / 50 mM Tris/HCl pH 7,2. Anschließend wurde die metallfreie SOR-Lösung gegen einen Puffer mit 8 M Harnstoff / 50 mM Tris/HCl pH 7,2 dialysiert, der zusätzlich das jeweilige Substitutionsmetall in einer Konzentration von 100  $\mu$ M und 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt, um das Metall im reduzierten Zustand zu halten. Für die Rückfaltung der SOR in den beiden nächsten Dialyseschritten wurde der identische Dialysepuffer genutzt, die Konzentration von Harnstoff aber auf 2 M reduziert und in der darauffolgenden Dialyse kein weiterer Harnstoff eingesetzt. In einer abschließenden Dialyse gegen Puffer W wurden restliche Metallionen aus der Lösung entfernt. Nach der Rückfaltung präzipitiertes Protein wurde durch Ultrazentrifugation (100.000 x g für 10 min, 45 Ti, Beckman Instruments) entfernt. Um die Reinheit der rückgefalteten SOR-Präparation zu erhöhen, wurde die Proteinlösung mittels *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie gereinigt (3.3.1). Abschließend erfolgte eine Dialyse der gereinigten Fraktionen gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,2.

Bei allen Dialyseschritten wurde die Proteinlösung dreimal gegen 1 L des jeweiligen Dialysepuffers dialysiert (2 x 4 h und 1 x über Nacht). Alle Dialysen wurden bei 4 °C durchgeführt.

Zur Minimierung von Metallkontaminationen wurden alle Dialysepuffer vor Gebrauch mit Chelex 100 behandelt. Hierzu wurden 50 g/L Chelex 100 in den jeweiligen Dialysepuffer gegeben, für 1 - 2 h rührend bei RT inkubiert und anschließend durch Filtration (Millipore Express PLUS Membranfilter 0,22  $\mu$ m, Merck Millipore, Darmstadt) wieder entfernt. Zudem wurden alle Glaswaren, Rührfische, Verschlussklammern für Dialyseschläuche und Sterilfilter vor ihrer Verwendung mit 37 % Salzsäure (Rotiporan; Art.-Nr. 4625.2) gewaschen und ausschließlich hochreine Metalle (Mindestreinheit 5N) für Metallsubstitutionen verwendet. Elementares Gallium (7N) wurde in einer Konzentration von 100 mM für 72 h bei RT in 37 % HCl gelöst.

Die rückgefalteten Fraktionen wurden für Aktivitätstest, ESR-Spektroskopie, Kristallisation und ICP-Messungen eingesetzt. Die Konzentrationen wurden für die ESR-Spektroskopie auf ca. 9 mg/mL und für die Kristallisation auf ca. 13 mg/mL eingestellt (Centricon, 30K MWCO, Amicon, Beverly, USA oder Macrosep, 30K MWCO, Pall Corporation, Ann Arbor, USA).

### 3.4. Analytische Methoden

#### 3.4.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Reinheit von Proteinproben wurde mittels SDS-PAGE überprüft (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; Schägger & Von Jagow, 1987). Hierbei werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die Zusammensetzung der SDS-Gele ist in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Polyacrylamidgele nach Schägger

Schägger-Gele		
	Sammelgel 4 %	Trenngel 10 %
Rotiphorese® Gel 30 [mL]	2	9
Schägger-Gelpuffer [mL]	3,5	9
60 % Glycerin [mL]	-	3
ddH <sub>2</sub> O [mL]	9	6
TEMED [ $\mu$ L]	40	40
APS (10%) [ $\mu$ L]	200	200

Die Proben wurden vor dem Auftrag im Verhältnis 3:1 mit Auftragspuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde mit dem Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (BioRad, Hercules, USA) bei einer konstanten Spannung von 100 V (peqPOWER E250, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Die Gele wurden über Nacht mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung (Roti-Blue, Roth, Karlsruhe) gefärbt und am Folgetag mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Alternativ wurden die Gele mit RAPIDstain (G-Biosciences, St Louis, USA) nach Herstellerangaben gefärbt.

#### 3.4.2. Proteinquantifizierung

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) oder der Bicinchoninsäure(BCA)-Methode (Smith *et al.*, 1985).

Bei der Proteinquantifizierung nach Bradford wurden zu 20  $\mu$ L Proteinlösung 980  $\mu$ L Bradford-Reagenz hinzugefügt, der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm gegen ddH<sub>2</sub>O bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichgerade ermittelt, die mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen erstellt wurde.

Die Bestimmung des Proteingehalts nach der BCA-Methode wurde mit dem BCA Protein Assay-Kit (G-Biosciences, St Louis, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

---

### 3.4.3. SOR-Aktivitätstest

Die spezifische Aktivität von SOR-Präparationen wurde mit dem SOR-Aktivitätstest bestimmt (Kletzin 1989, Urich *et al.*, 2004). Hierzu wurden definierte Mengen des gereinigten Enzyms (meist 1 - 5  $\mu\text{g}$ ) in 500  $\mu\text{L}$  Enzymtestpuffer gegeben und der Testansatz bei 80 °C (*HnSOR*) oder 85 °C (*AaSOR*) inkubiert. Die Reaktion wurde zu definierten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 8, 10 min) auf Eis gestoppt und der Schwefel durch Zentrifugation (16.060 g für 1 min, Heraeus Biofuge Pico, Thermo Scientific, Dreieich) sedimentiert. Für jeden Messzeitpunkt wurde ein separater Enzymtestansatz angesetzt. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte Thiosulfat, Sulfit und Schwefelwasserstoff erfolgte kolorimetrisch durch die jeweiligen Nachweisreaktionen mit entsprechenden Eichgeraden. Die spezifischen Aktivitäten wurden über den linearen Anstieg der Reaktionsprodukte ermittelt. 1 U Enzymaktivität wurde als die Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  Thiosulfat + Sulfit (Oxygenaseaktivität) beziehungsweise 1  $\mu\text{mol}$  Schwefelwasserstoff (Reduktaseaktivität) pro Minute definiert.

Aktivitätstests zur Erstellung des temperaturabhängigen Aktivitätsprofils wurden für den Temperaturbereich von 70 - 98 °C in einem Wasserbad durchgeführt. Hierzu wurden 1 mL SOR-Enzymtestpuffer in Reagenzgläser vorgelegt, bis zum Erreichen der gewünschten Temperatur vorinkubiert, anschließend die Proteinlösung zugegeben und schüttelnd inkubiert. Für die Bestimmung der Aktivität bei niedrigen Temperaturen wurden bis zu 100  $\mu\text{g}$  gereinigtes Protein in 500  $\mu\text{L}$  Puffer Enzymtestpuffer je Messzeitpunkt eingesetzt und die Messintervalle auf bis zu 10 min ausgeweitet.

Aktivitätstests zur Untersuchung der Produktbildung bei unterschiedlichen pH-Werten wurden in Citrat-Phosphat-Enzymtestpuffer, basierend auf einem Citrat-Phosphat-Puffer (nach McIlvaine, 1921), durchgeführt.

### 3.4.4. Thiosulfat-Assay

Die Nachweismethode basiert auf der Entfärbung von Methylenblau durch Thiosulfat. Zu 50  $\mu\text{L}$  Enzymtestansatz wurden 200  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O und 750  $\mu\text{L}$  Methylenblaulösung (12 mg/L Methylenblau in 5 M HCl, Pachmair, 1960) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurde die Absorption bei 670 nm gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenz ermittelt. Die Ermittlung des Thiosulfatgehalts erfolgte durch Nutzung einer mit Natriumthiosulfat erstellten Eichreihe im Stoffmengenbereich von 0 bis 100 nmol.

---

### 3.4.5. Sulfit-Assay

Grundlage des Sulfit-Assay ist die Reduktion von Fuchsin durch Sulfit. Die Zugabe von Formalin (37 % Formaldehyd) bewirkt die Bildung eines stabilen, lilafarbenen Komplexes, der bei 570 nm quantifiziert werden kann (Pachmair, 1960). Hierzu wurden 400  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O und 50  $\mu\text{L}$  Fuchsinlösung (40 mg Fuchsin in 88,5 mL ddH<sub>2</sub>O + 12,5 mL konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) vorgelegt und 50  $\mu\text{L}$  Enzymtestansatz zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden 5  $\mu\text{L}$  Formalin hinzugefügt und der Ansatz gründlich gemischt. Nach einer Inkubation über 90 min bei RT erfolgte die Messung der Absorption bei 570 nm gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenz. Die Ermittlung des Sulfitgehalts basierte auf der Nutzung einer mit Natriumsulfit erstellten Eichreihe im Stoffmengenbereich von 0 bis 20 nmol.

### 3.4.6. Schwefelwasserstoff-Assay

Die Quantifizierung von Schwefelwasserstoff basiert auf der durch Fe<sup>3+</sup> katalysierten Bildung von Methylenblau aus Schwefelwasserstoff und N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin (King und Morris, 1967). Die Reagenzien wurden in der folgenden Reihenfolge zugefügt:

250  $\mu\text{L}$  2,6 % [w/v] Zinkacetat in 0,1% [v/v] Essigsäure  
300  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O  
50  $\mu\text{L}$  Enzymtestansatz  
125  $\mu\text{L}$  0,1% [w/v] N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin-Dihydrochlorid in 5 M HCl  
50  $\mu\text{L}$  11,5 mM FeCl<sub>3</sub> in 0,6 M HCl

Nach einer Inkubationszeit von 12 - 24 h wurde die Absorption bei 670 nm gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenz ermittelt. Die Ermittlung des Schwefelwasserstoffgehalts erfolgte durch Nutzung einer mit Ammoniumsulfid erstellten Eichreihe im Stoffmengenbereich von 0 bis 30 nmol.

### 3.4.7. Eisenquantifizierung

Zur Quantifizierung des Eisengehalts gereinigter SOR-Präparationen wurde eine auf dem Farbstoff 2,4,6-Tripyridyl-1,3,5-triazin (TPTZ) basierende kolorimetrische Messtechnik angewandt (Fischer & Price, 1964). Hierbei bilden TPTZ und zweiwertige Eisen-Ionen einen blauen Komplex, dessen Absorption bei 593 nm quantifiziert werden kann.

Ein definiertes Volumen gereinigter Proteinlösung, das zwischen 5 - 10 nmol gereinigter SOR (bezogen auf eine Untereinheit) beinhaltet, wurde vorgelegt und der Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O auf 800  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Zur Denaturierung der SOR und Extraktion des Eisens wurden 100  $\mu\text{L}$  8 M HCl zugefügt, invertiert und für 10 min bei RT inkubiert. Um das Protein zu präzipitieren, wurden dem Ansatz

---

100  $\mu\text{L}$  80 % [w/v] TCA-Lösung zugegeben, erneut für 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (16.060 g für 10 min, Heraeus Biofuge Pico, Thermo Scientific, Dreieich). Zur Neutralisation wurden 250  $\mu\text{L}$  75 % [w/v] Ammoniumacetat zu 800  $\mu\text{L}$  des Überstandes zugegeben. Das in der Lösung enthaltene  $\text{Fe}^{3+}$  wurde durch die Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  10 % [w/v] Hydroxylamin zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. Unmittelbar nach dem Hinzufügen von 100  $\mu\text{L}$  4 mM TPTZ-Lösung wurde die Absorption bei 593 ermittelt. Als Referenz diente ein Ansatz mit 800  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, mit dem nach identischer Methode verfahren wurde. Die Ermittlung des Eisengehalts erfolgte durch Nutzung einer mit Eisen(II)-sulfat erstellten Eichreihe im Stoffmengenbereich von 0 bis 20 nmol.

### 3.4.8. Untersuchung der Thiosulfatbildung in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen

Der SOR-Aktivitätstest (3.4.3) wurde bei 30 °C in Citrat-Phosphat-Enzymtestpuffer mit den pH-Werten 4, 5, 6 und 7 (nach McIlvaine, 1921) durchgeführt und 50 - 100  $\mu\text{g}$  gereinigte AaS<sub>OR</sub> je Testansatz zugefügt. Die gebildeten Produktmengen wurden in Intervallen à 10 Minuten ermittelt. Für die Kontrollreaktionen der nichtenzymatischen Thiosulfatbildung wurden identische Versuchsbedingungen gewählt, dem Testansatz jedoch kein Enzym zugegeben. Stattdessen wurden 100 nmol Natriumsulfit oder 200 nm Natriumthiosulfat hinzugefügt und die Stoffmengen von Sulfit und Thiosulfat über den Versuchszeitraum dokumentiert.

### 3.4.9. Inhibitor-Assays

Die Durchführung der Inhibitor-Assays basiert auf dem SOR-Aktivitätstest (3.4.3). 1 - 5  $\mu\text{g}$  gereinigter AaS<sub>OR</sub> wurden mit 500  $\mu\text{L}$  Citrat-Phosphat-Enzymtestpuffer gemischt und die zu testenden Verbindungen in definierten Konzentrationen im Bereich von 0,01 - 10 mM bzw. 0,001 - 1 % zugegeben. Die Verdünnung der Substanzen erfolgte dabei in DMF. Nach gründlichem Mischen der Reaktionsansätze wurden diese für 30 min bei RT inkubiert und der Aktivitätstest wie zuvor beschrieben durchgeführt. Als Kontrollen wurde jeweils eine enzymatische Reaktion ohne Inhibitor sowie eine nichtenzymatische Reaktion mit Inhibitor, jedoch ohne AaS<sub>OR</sub>, durchgeführt. Für alle identifizierten Inhibitoren wurden die mittleren inhibitorischen Konzentrationen ( $\text{IC}_{50}$ ) bestimmt. Hierzu wurde für jede Inhibitorkonzentration die relative Aktivität in Bezug auf die nichtinhibierte Kontrollreaktion berechnet. In einer Inhibitionskurve wurde die daraus resultierende prozentuale Inhibition gegen die entsprechende Inhibitorkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe der Steigung der Regressionsgeraden im linearen Bereich der sigmoidalen Kurve wurden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte ermittelt.

---

## 3.5. Spektroskopische Methoden

### 3.5.1. UV/VIS-Spektroskopie

Zur Aufnahme von UV/VIS-Spektren und Messung der Absorption bei definierten Wellenlängen wurde das UV/VIS-Spektralphotometer Evolution 220 (Thermo Scientific, Dreieich) verwendet. Die Messung der Spektren erfolgte bei RT mit einer Bandbreite von 2 nm und einer Messgeschwindigkeit von 1200 nm/min bei einer Integrationszeit von 0,05 s. Messungen bei spezifischer Wellenlänge wurden bei RT mit einer Bandbreite von 1 nm und einer Integrationszeit von 0,5 s durchgeführt.

### 3.5.2. CD-Spektroskopie

Die Sekundärstrukturen der rekombinanten AaSOR-Wt sowie der rückgefalteten SOR-Präparationen mit Eisen, Cobalt und Mangan wurden mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie unter Anleitung von Philipp Czechowski in der Arbeitsgruppe von Prof. Reggelin am Fachbereich Chemie der TU Darmstadt analysiert. Hierzu wurde ein JASCO J-810 Spectropolarimeter verwendet und zehn aufeinanderfolgende Messungen im Fern-UV-Bereich (190 - 260 nm) bei 20 °C durchgeführt. Gewählt wurden Messintervalle von 0,5 nm, eine Messgeschwindigkeit von 50 nm/min und eine Bandbreite von 1 nm bei einer Antwortzeit von 1 s. Zur Erstellung eines Temperaturprofils wurde in Abständen von jeweils 10 °C ein Spektrum aufgenommen. Der Temperaturbereich lag zwischen 10 und 80 °C. Vor der Analyse wurden die AaSOR-Präparationen gegen 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 dialysiert und auf eine Konzentration von 100 µg/mL eingestellt. Die Messungen erfolgten in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm. Von den erhaltenen Spektren wurden die Messwerte der Pufferlösung subtrahiert und aus der so ermittelten Elliptizität  $\theta$  die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\theta]_{\text{MRW}}$  kalkuliert (MRW: *mean residue weight*).

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta \times M}{10 \times c \times d \times n}$$

mit	$[\theta]_{\text{MRW}}$	mittlere molare Elliptizität pro Rest [deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> ]
	$\theta$	gemessene Elliptizität [deg]
	M	Molekulargewicht [g/mol]
	c	Proteinkonzentration [g/mL]
	d	Schichtdicke der Küvette [cm]
	n	Anzahl der Aminosäuren

Die Dekonvolution der Datensätze aus der CD-Spektroskopie sowie Analyse und Quantifizierung der Sekundärstrukturelemente erfolgte mit der CDNN-Software (Böhm *et al.*, 1992).



---

### 3.5.3. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) können Atome mit ungepaarten Elektronen detektiert werden. Untersucht wurden AaSOR-Präparationen, bei denen das Eisenatom im aktiven Zentrum durch verschiedene Metalle substituiert worden war. Die ESR-Spektren wurden dabei jeweils vor und nach der SOR-Reaktion gemessen, um so eine Änderung des Redoxzustands der Metallzentren bestimmen zu können. Die Durchführung der ESR-Experimente erfolgte am ITQB (Oeiras, Portugal) in der Arbeitsgruppe von Miguel Teixeira mit der Unterstützung von Célia V. Romão und Miguel Teixeira.

Die SOR-Präparationen mit dem jeweiligen Austauschmetall wurden gegen 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 dialysiert und zu einer finalen Konzentration im Bereich von 9,77 - 12,42 mg/mL (0,27 – 0,34 mM (bezogen auf eine Untereinheit)) konzentriert. Der jeweilige Dialysepuffer diente als Referenzwert für die ESR-Messungen. Vor der Messung wurden je 300  $\mu$ L Probe in ein ESR-Röhrchen überführt und vorsichtig in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Durchführung der SOR-Reaktion wurden die ESR-Röhrchen nach der ersten Messung vorsichtig in Wasser bei RT aufgetaut, die Proteinlösung in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe einer Spatelspitze elementaren Schwefels für 15 min bei 80 °C auf dem Heizblock inkubiert. Die Proteinlösung wurde unverzüglich zurück in die jeweiligen ESR-Röhrchen gegeben und für die Messung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

In einer finalen Messung wurden die Proben mit Natriumdithionit reduziert. Hierzu wurde die Proteinlösung im ESR-Röhrchen erneut in Wasser bei RT aufgetaut und für 5 min unter Argonatmosphäre anaerobisiert. Nach der Zugabe von 50  $\mu$ L einer anaerobisierten 50 mM Natriumdithionitlösung pH 7,8 wurden die ESR-Röhrchen wieder zur finalen Messung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Messungen von ESR-Spektren der rückgefalteten, metallsubstituierten SOR-Präparationen wurden mit einem Bruker EMX ESR-Spektrometer, in Kombination mit einem ESR 900 Helium-Kryostat, bei 7 K, einer Mikrowellenfrequenz von 9,4 GHz, 2,0 mW Mikrowellenleistung und 1 mT Amplitudenmodulation durchgeführt.

### 3.6. Elektronenmikroskopie

Die Proteinlösungen wurden vor ihrer Verwendung auf eine Konzentration von 100  $\mu$ g/mL eingestellt. Die Probenvorbereitung und die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Andreas Klingl (Biozentrum der LMU München) durchgeführt.

## 3.7. Röntgenkristallographie

### 3.7.1. Kristallisation

Die Kristallisation der unterschiedlichen SOR-Varianten erfolgte am ITQB (Oeiras, Portugal) unter der Anleitung von Carlos Frazão. Für die Kristallisation der in Tabelle 6 aufgelisteten Proteine wurden alle Proteinlösungen gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert und durch Zentrifugation in Mikrokonzentratoren auf die aufgelisteten finalen Konzentrationen konzentriert (Centricon, 30K MWCO, Amicon, Beverly, USA oder Macrosep, 30K MWCO, Pall Corporation, Ann Arbor, USA). Dem Dialysepuffer der AaSOR-Mutante I<sub>47</sub>W wurden zudem 10 % [v/v] Glycerin zugesetzt, um das Protein zu stabilisieren.

**Tabelle 6:** Übersicht der für die Kristallisation eingesetzten Proteinproben mit den jeweiligen finalen Konzentrationen.

Probenname	Abkürzung	Konzentration
<i>H. neapolitanus</i> SOR-Wt	HnSOR	13,1 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR Cobalt-Derivat	Co-SOR	13,3 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR Gallium-Derivat	Ga-SOR	14,1 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR Mangan-Derivat	Mn-SOR	13,8 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR Nickel-Derivat	Ni-SOR	13,0 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR Mutante Y <sub>102</sub> G	Y <sub>102</sub> G	13,2 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR Mutante I <sub>47</sub> W	I <sub>47</sub> W	11,0 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR inhibiert mit Diallyltrisulfid	DATS-SOR	13,7 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR inhibiert mit Dimethyldisulfid	DDS-SOR	14,0 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR inhibiert mit Di-tert-Butylpolysulfid	DTBPS-SOR	13,4 mg/mL
<i>Ac. ambivalens</i> SOR inhibiert mit Knoblauchöl	GO-SOR	13,0 mg/mL

Für die Suche geeigneter Kristallisationsparameter wurde für alle SOR-Varianten ein einleitendes Kristallisations-Screening mit einem Minibee Microsys 4000 XL Roboter (Genomic Solutions, Ann Arbor, USA) durchgeführt. Das Screening wurde in 96 Kavitäten umfassenden Proteinkristallisationsplatten (Greiner, Frickenhausen), basierend auf der *sitting-drop* Dampfdiffusion, bei einer konstanten Temperatur von 20 °C vorgenommen. 0,1 µL Proteinlösung wurden mit 0,1 µL Kristallisationslösung versetzt und gegen 30 µL Kristallisationslösung äquilibriert. Die Kristallisationslösungen stammten aus dem 96 Kristallisationsbedingungen umfassenden Structure Screen 1 + 2 HAT-96 Kit (Molecular Dimensions, Suffolk, Großbritannien). Der Erfolg der Kristallisation wurde mikroskopisch (Leica MZ 16) anhand der Kristallbildung, -form und -größe dokumentiert. Die unterschiedlichen SOR-Varianten kristallisierten bei jeweils mehreren Bedingungen, wobei erfolgsversprechende Kristallisationsbedingungen weiter optimiert wurden. Dabei wurden Parameter wie der pH-Wert oder die Konzentrationen von Salzen und Additiven variiert. Die Optimierung basierte dabei auf der

*hanging-drop* Dampfdiffusion und wurde in Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten (Greiner, Frickenhausen) durchgeführt. Protein- und Kristallisationslösung wurden in einem Gesamtvolumen von 2  $\mu$ L in einem Verhältnis von 1:1, 2:1 oder 3:1 gemischt und gegen 500  $\mu$ L Kristallisationslösung äquilibriert. Die finalen Kristallisationsbedingungen sowie die gewählten Kryoprotektivumlösungen (McFerrin, 2002) sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7:** Kristallisationsbedingungen und kryoprotektive Lösungen der verschiedenen SOR-Proteine.

Protein	Kristallisationsbedingung	Kryoprotektive Lösung
<i>Hn</i> SOR	0,1 M ADA pH 6,4 1 M Ammoniumsulfat	0,1 M ADA pH 6,4 1,3 M Ammoniumsulfat 25 % Glycerin
Co-SOR	0,1 M HEPES pH 7,5 1,0 M Natriumacetat 0,005 M Cadmiumsulfat	0,1 M HEPES pH 7,5 1,0 M Natriumacetat 0,005 M Cadmiumsulfat 25 % [v/v] Glycerin
Ga-SOR	0,1 M Natriumacetat pH 4,8 0,2 M NaCl 30 % [v/v] MPD	0,1 M Natriumacetat pH 4,8 0,2 M NaCl 30 % [v/v] MPD
Mn-SOR	0,1 M HEPES pH 7,5 1,0 M Natriumacetat 0,005 M Cadmiumsulfat	0,1 M HEPES pH 7,5 1,0 M Natriumacetat 0,005 M Cadmiumsulfat 25 % [v/v] Glycerin
Ni-SOR	0,1 M HEPES pH 7,5 1,0 M Natriumacetat 0,005 M Cadmiumsulfat	0,1 M HEPES pH 7,5 1,0 M Natriumacetat 0,005 M Cadmiumsulfat 25 % [v/v] Glycerin
Y <sub>102</sub> G	0,1 M Natriumacetat pH 4,6 2,0 M Natriumformiat	0,1 M Natriumacetat pH 4,6 2,0 M Natriumformiat 35 % [v/v] Glycerin
I <sub>47</sub> W	0,1 M Natriumacetat pH 4,2 2,0 M Natriumformiat	0,1 M Natriumacetat pH 4,2 2,0 M Natriumformiat 35 % [v/v] Glycerin
DATS-SOR	0,1 M Natriumacetat pH 4,6 2,0 M Natriumformiat	0,1 M Natriumacetat pH 4,6 2,0 M Natriumformiat 35 % [v/v] Glycerin
DDS-SOR	0,1 M Natriumcacodylat pH 6,1 1,4 M Natriumacetat	0,1 M Natriumcacodylat pH 6,1 1,4 M Natriumacetat 30 % [v/v] Glycerin
DTBPS-SOR	0,1 M Natriumcitrat pH 5,6 1,0 M Ammoniumphosphat	0,1 M Natriumcitrat pH 5,6 1,0 M Ammoniumphosphat 30 % [v/v] Glycerin
GO-SOR	0,4 M Ammoniumphosphat	0,4 M Ammoniumphosphat 35 % [v/v] Glycerin

---

### 3.7.2. Kristallographische Charakterisierung, Röntgenstrukturanalyse und *Refinement*

Die Datensätze der Röntgendiffraktion wurden von Carlos Frazão (ITQB, Oeiras, Portugal) mit Synchrotronstrahlung der Strahlenquellen ESRF ID-29 (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, Frankreich), DLS I04 (Diamond Light Source, Oxfordshire, England) und DESY P14 (Deutsches Elektronen-Synchrotron in der Helmholtz-Gemeinschaft, Hamburg) gesammelt. Die Analyse und Bearbeitung der Rohdaten, *Phasing*, sowie die Erstellung der initialen Elektronendichtekarten und Strukturmodelle wurden ebenfalls von Carlos Frazão durchgeführt.

### 3.7.3. Modell-Analyse

Die Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente in der 3D-Struktur der *HnSOR* wurde mit der PROMOTIF-Software (Hutchinson und Thornton, 1996) des SWISS-MODEL-Servers (<http://swissmodel.expasy.org/>; Arnold *et al.*, 2006) analysiert.

Der RMSD (*Root Mean Square Deviation*)-Wert zwischen zwei Strukturen wurde mit PDBeFold (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>; Krissinel und Henrick, 2004) berechnet.

Die Erstellung von Ramachandran Plots erfolgte mit Mol Probity (Chen *et al.*, 2010).

Alle in dieser Arbeit verwendete Abbildungen von Strukturmodellen wurden mit PyMOL (DeLano, 2002) oder WinCoot erstellt (Crystallographic Object-Oriented Toolkit; Emsley *et al.*, 2010).

### 3.7.4. Homologie-Modellierung

Die Modellierung von SOR-Mutanten wurde mit Hilfe des SWISS-Model-Servers (<http://swissmodel.expasy.org/>; Arnold *et al.*, 2006) durchgeführt. Als *template* dienten dabei die Kristallstruktur der *AaSOR*-Wt (PDB id: 2cb2; Urich *et al.*, 2006) und die vorläufige Kristallstruktur der *HnSOR* (Veith, 2011a).

### 3.7.5. Porenanalysen

Zur systematischen Suche und Charakterisierung von Poren und Kanälen in der SOR wurden die Programme MOLE 2.13.96 (Sehna *et al.*, 2013), CAVAR Analyst 1.0 (Kozlikova *et al.*, 2014) und das PyMOL *Plugin* CAVAR 3.0.1 (Chovancova *et al.*, 2012) verwendet. Als Startpunkte für die Suche wurden in der Regel das Eisenzentrum und/oder der Mittelpunkt der zentralen inneren Kavität des Holoenzym gewählt. Bei der Analyse mittels MOLE wurden abweichend von den Standard-Parametern der *Bottleneck Radius* (0,8 – 1,4 Å), *Bottleneck Length* (3 – 5 Å) und der *Surface Cover Radius* (5 – 15 Å) variiert. In CAVAR Analyst und dem PyMOL *Plugin* CAVAR wurde der Parameter *min. probe radius* (0,6 – 0,9 Å) angepasst.

---

### 3.8. Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) wurde zur Analyse und Quantifizierung der Metallzusammensetzung in den Präparationen der Heterometall-SORs durchgeführt. Dabei erfolgte ein allgemeines Screening der in den Proteinlösungen enthaltenen chemischen Elemente, sowie eine exakte Quantifizierung von Eisen, Zink und der verwendeten Austauschmetalle ( $\mu\text{g Metall}/500 \mu\text{L Testansatz}$ ). Für die Analyse wurden  $12,5 \mu\text{L}$  der zu analysierenden Lösung zu  $487,5 \mu\text{L}$  Carrierlösung (0,5 % [v/v] HCl, 2 % [v/v]  $\text{HNO}_3$ ) gegeben. Untersucht wurden  $12,5 \mu\text{L}$  und  $2,5 \mu\text{L}$  Proteinlösung, wobei das fehlende Volumen durch Dialysepuffer ergänzt wurde. Als Referenz diente der letzte bei der Rückfaltung verwendete Dialysepuffer. Zusätzlich wurde eine Kontrollmessung mit  $4 \text{ nmol}$  der verwendeten hochreinen Metallsalze in Dialysepuffer durchgeführt, um Kontaminationen der Ausgangsmaterialien auszuschließen. Die Analysen wurden von Niklas Brenner durchgeführt.

---

## Ergebnisübersicht

---

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in den folgenden Kapiteln 4 - 9 dargestellt.

**Kapitel 4** beschäftigt sich mit den Reaktionsprodukten der SOR und der Frage, ob das im Enzymtest nachweisbare Thiosulfat ein Produkt der SOR-Reaktion darstellt oder ausschließlich durch eine nicht-enzymatische Reaktion von Sulfit und elementarem Schwefel entsteht. Durch Erniedrigung von Temperatur und pH-Wert wurde die nicht-enzymatische Thiosulfatbildung unterbunden und ausschließlich die primären Produkte der SOR quantifiziert.

**Kapitel 5** beinhaltet das Screening und die Charakterisierung organischer Schwefelverbindungen mit inhibitorischem Effekt auf die SOR. Nach der Präparation stabiler SOR-Inhibitor-Komplexe wurden die Bindungsstellen geeigneter Inhibitoren mittels röntgenkristallographischer Analysen identifiziert.

**Kapitel 6** umfasst die Rückfaltung denaturierter *AaSOR inclusion bodies* in Gegenwart hochreiner Metalle und deren Charakterisierung. Untersucht wurden die enzymatische Aktivität, der Redoxzustand der Substitutionsmetalle vor und nach der Katalyse via ESR-Spektroskopie sowie die Metallzusammensetzung im aktiven Zentrum durch Röntgenstrukturanalysen und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma.

**Kapitel 7** konzentriert sich auf die Beschreibung einer neuen Kristallstruktur der SOR aus *Halothiobacillus neapolitanus* und umfasst die strukturelle Analyse des Enzyms, Vergleiche mit der Kristallstruktur der *AaSOR* und die Überprüfung des Modells der postulierten Substrat- und Produktwege innerhalb von SORs. Es werden die Ergebnisse einer softwaregestützte Suche nach Poren und Kanälen innerhalb des Enzyms vorgestellt.

**Kapitel 8** beschreibt die Untersuchung der Zugangsporen zum aktiven Zentrum von *AaSOR* und *HnSOR* durch ortsspezifische Mutagenese. Basierend auf modellierten 3D-Strukturen wurden Enzymvarianten mit verschlossenen bzw. vergrößerten Poren generiert und deren Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität bestimmt.

**Kapitel 9** beinhaltet Mutationsanalysen an der sekundären Koordinationssphäre von *AaSOR* und *HnSOR* und beschreibt deren Bedeutung für die Aktivität des Enzyms.



---

## 4. Die primären Reaktionsprodukte der SOR

---

### 4.1. Einleitung

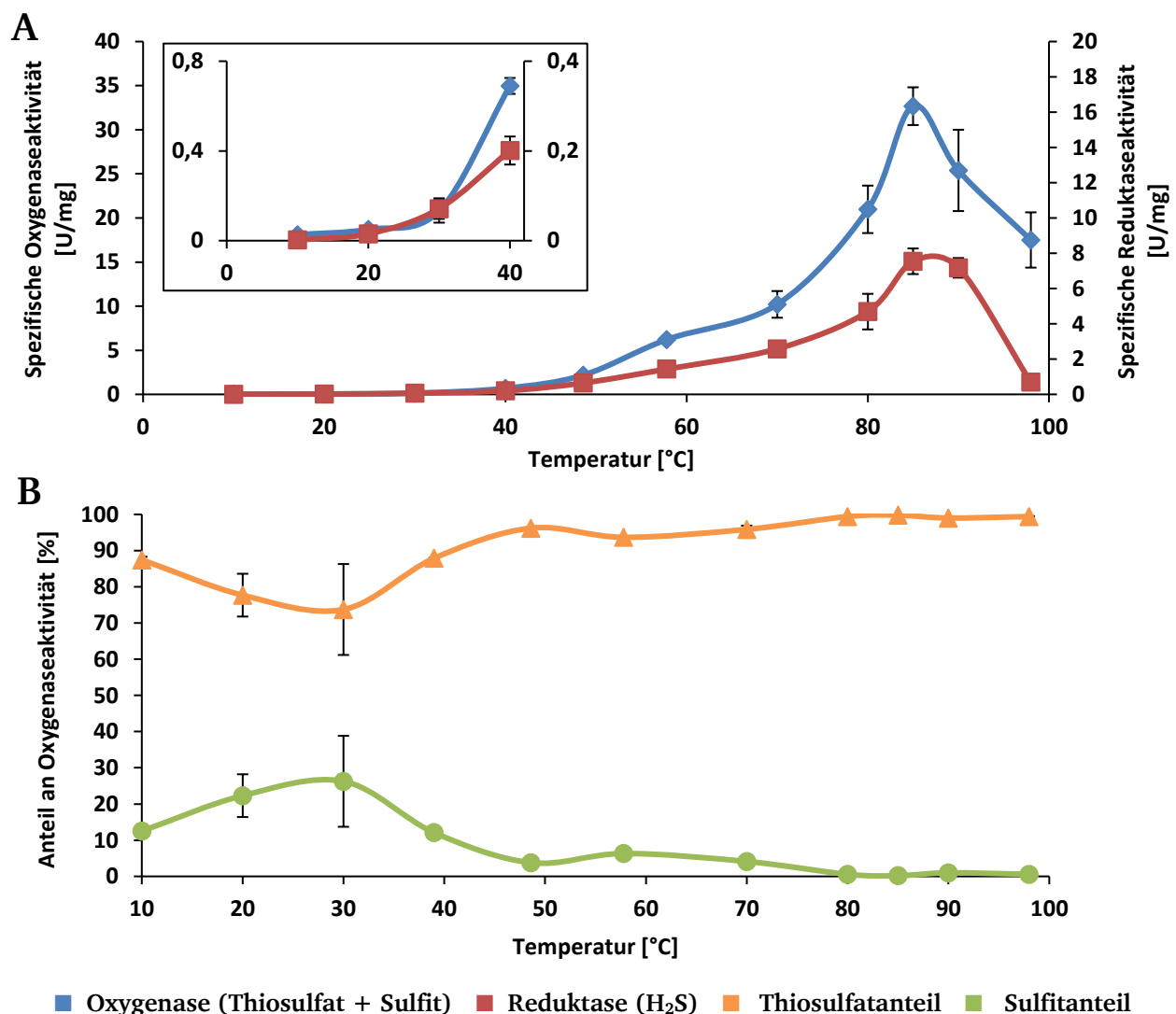
SORs katalysieren die sauerstoffabhängige Disproportionierung von elementarem Schwefel mit Thiosulfat, Sulfit und Schwefelwasserstoff als nachweisbaren Produkten. Die optimalen Reaktionsbedingungen der AaSOR sind eine Temperatur von 85 °C und ein pH-Wert zwischen 7,0 und 7,4 (Kletzin, 1989). Unter diesen Reaktionsbedingungen wird hauptsächlich Thiosulfat als Produkt der Oxygenasereaktion nachgewiesen, Sulfit hingegen nur in sehr geringen Mengen. Dies basiert auf einer schnellen nichtenzymatischen Reaktion von Sulfit mit elementarem Schwefel, bei der in Abhängigkeit der Temperatur und einem  $\text{pH} \geq 5$  Thiosulfat entsteht (Roy & Trudinger, 1970; Kletzin, 1989). In Kontrollexperimenten wurde bereits gezeigt, dass bei der SOR-Reaktion Thiosulfat hauptsächlich durch diese nichtenzymatische Reaktion entsteht. Bei der Erstellung eines Temperaturprofils der HnSOR wurden auch bei niedrigen Temperaturen (10 - 40 °C) beide Oxygenaseprodukte nachgewiesen (Veith *et al.*, 2012). Eine enzymatische Bildung von Thiosulfat durch die SOR konnte somit bislang nicht ausgeschlossen werden (Kletzin, 1989, Veith *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob Thiosulfat ein primäres Reaktionsprodukt der SOR darstellt oder lediglich als sekundäres Reaktionsprodukt durch die chemische, nichtenzymatische Reaktion von Sulfit und elementarem Schwefel entsteht. Hierzu wurde versucht, die nichtenzymatische Thiosulfatbildung durch Absenken der Temperatur und des pH-Wertes auszuschalten und unter diesen Reaktionsbedingungen die Oxygenaseprodukte der SOR zu quantifizieren.

### 4.2. Ergebnisse

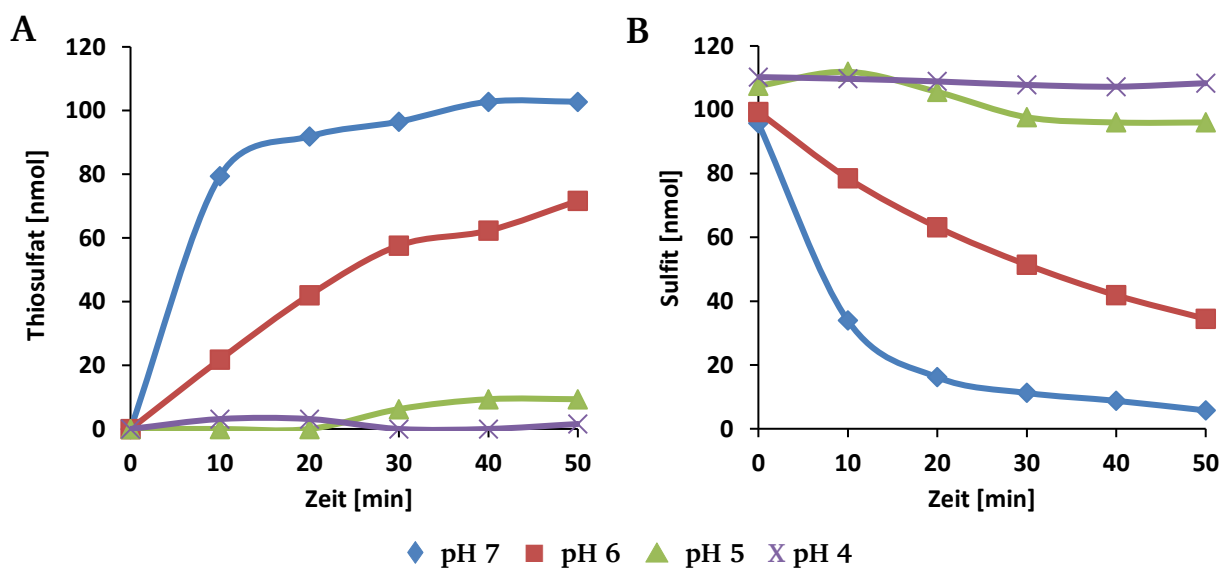
Zur Vermeidung der nichtenzymatischen Thiosulfatbildung war es nötig, die Aktivität der AaSOR bei niedrigeren Temperaturen als dem im SOR-Aktivitätstest verwendeten Temperaturoptimum von 85 °C zu bestimmen. Das bekannte Temperaturspektrum der AaSOR erstreckt sich über einen Bereich von 50 bis 108 °C (Kletzin, 1989). Um im unteren Temperaturbereich die gebildeten Produktmengen besser quantifizieren zu können, wurden der SOR-Aktivitätstest und die Produktnachweisreaktionen in dieser Arbeit optimiert (siehe 3.4.3) und deren Sensitivität verbessert. Daraufhin war es möglich, eine Aktivität der AaSOR unterhalb von 50 °C zu erfassen. Es wurde ein neues Temperatur-Aktivitätsprofil der AaSOR erstellt (Abb. 16A), um die bisher beschriebene untere Temperaturgrenze zu erweitern. Die Aktivität der AaSOR wurde über einen Temperaturbereich von 10 - 98 °C bestimmt. Für die Quantifizierung der Produktmengen im unteren Temperaturbereich von 40 - 50 °C wurden die Messintervalle auf 5 min, im Bereich von

10 - 30 °C auf 10 min ausgeweitet und Enzymmengen von 20 - 200 µg/mL eingesetzt. Unter optimalen Reaktionsbedingungen bei 85 °C betrug die maximale spezifische Oxygenaseaktivität 32,7 U/mg und die maximale spezifische Reduktaseaktivität 7,5 U/mg. Dies entspricht einem mehr als vierfachen Überschuss an Oxygenaseprodukten gegenüber den Reduktaseprodukten. SOR-Reaktionsprodukte wurden bis zu einer Temperatur von 10 °C detektiert. Bei dieser Temperatur lag die spezifische Oxygenaseaktivität bei 0,027 U/mg, die spezifische Reduktaseaktivität bei 0,002 U/mg. Abb. 16B zeigt den prozentualen Anteil der gebildeten Sulfid- und Thiosulfatmengen an der Oxygenaseaktivität bei den jeweiligen Temperaturen der Aktivitätsbestimmung. Zwischen 50 und 98 °C ist aufgrund der starken nichtenzymatischen Thiosulfatbildung kaum Sulfid nachweisbar (unter 5 %). Erst unterhalb von 40 °C steigt der Anteil an detektierbarem Sulfid auf 12 - 26 % mit einem Maximum bei 30 °C an. Eine Thiosulfatbildung war bei allen gemessenen Temperaturen zu beobachten.



**Abbildung 16:** (A) Temperaturprofil der AaSOR bei pH 7,2. Linke Y-Achse: Spezifische Oxygenaseaktivität. Rechte Y-Achse: Spezifische Reduktaseaktivität. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung des Bereichs bei niedrigen Temperaturen. (B) Prozentualer Anteil der gebildeten Sulfid- und Thiosulfatmengen an der Oxygenaseaktivität bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten in Triplikaten.

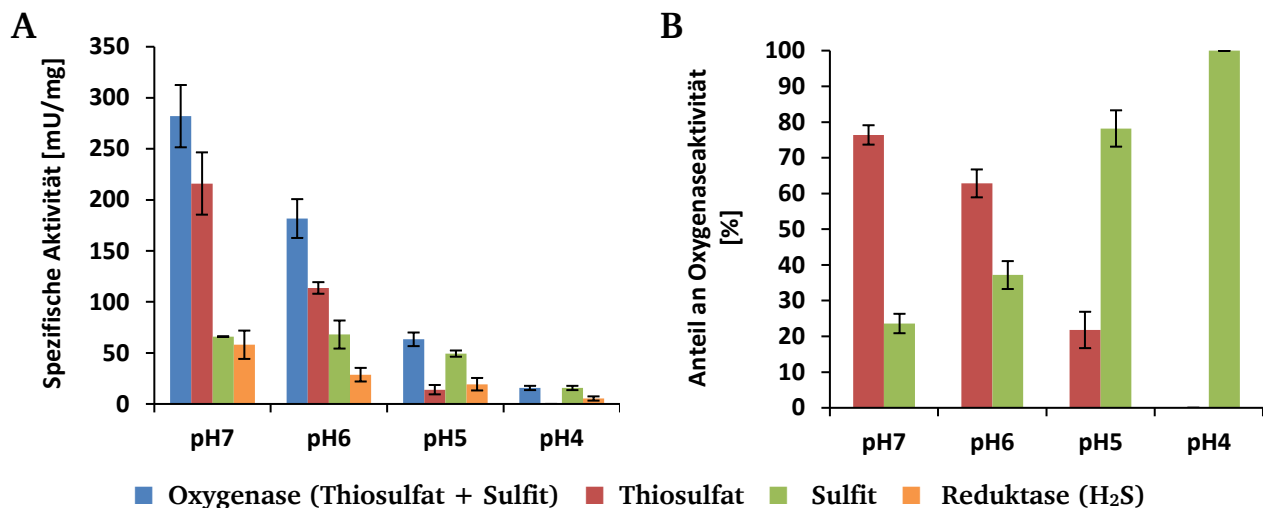
Als zweiter Parameter wurde der pH-Wert erniedrigt, um die nichtenzymatische Reaktion weiter abzuschwächen und final auszuschalten. Hierzu wurde im Vorfeld die nichtenzymatische Thiosulfatbildung analog zum Aktivitätstest bei 30 °C in Abhängigkeit des pH-Wertes bestimmt, jedoch unabhängig von einer enzymatischen Aktivität (Abb. 17). Es erfolgte die Inkubation von 100 nmol Natriumsulfit über einen Zeitraum von 50 min bei pH-Werten zwischen 4 und 7 in 500  $\mu$ L Citrat-Phosphat-Enzymtestpuffer. Fand bei pH 7 eine annähernd vollständige Umsetzung des eingesetzten Sulfits mit elementarem Schwefel zu Thiosulfat statt, so verringerte sich die zu Thiosulfat konvertierte Menge mit absinkendem pH-Wert. Bei pH 4 konnte keine signifikante Thiosulfatbildung beobachtet werden. Entsprechend blieb die eingesetzte Sulfitmenge bei pH 4 über den gesamten Inkubationszeitraum konstant.



**Abbildung 17:** Kontrollexperimente zur nichtenzymatischen Thiosulfatbildung im SOR-Aktivitätstest bei 30 °C in Abhängigkeit des pH-Wertes über 50 min Inkubationszeit ohne Enzymzugabe. (A) Nichtenzymatische Thiosulfatbildung durch Reaktion von 100 nmol Sulfit mit elementarem Schwefel in 500  $\mu$ L Citrat-Phosphat-Enzymtestpuffer. (B) Verbrauch von Sulfit durch die nichtenzymatische Reaktion.

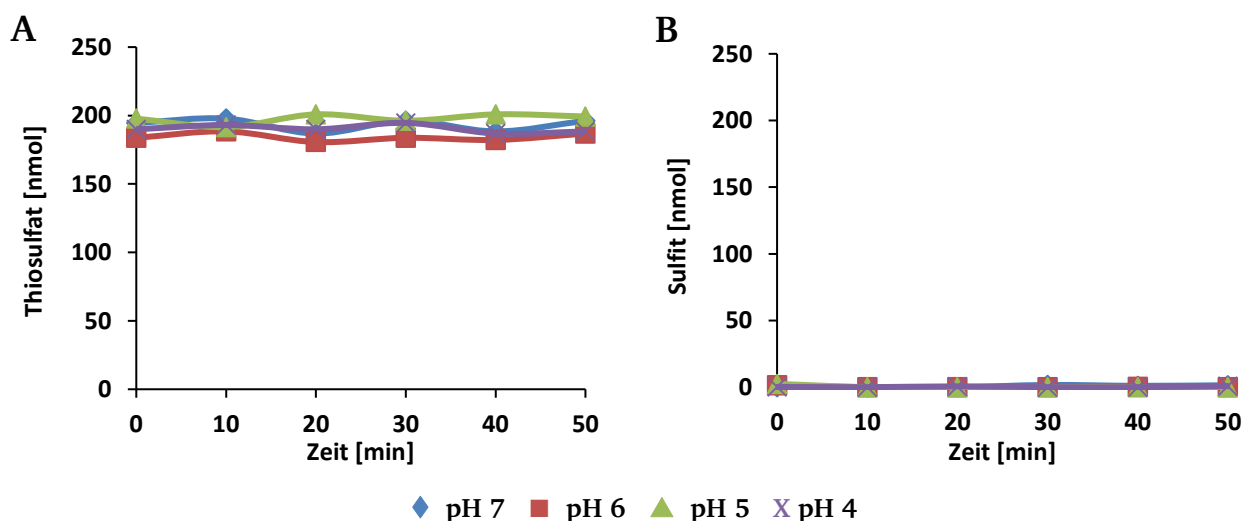
Nach gleichem Vorgehen wurde die Aktivität der AaSOR bei 30 °C und pH-Werten zwischen 4 und 7 bestimmt. Die gebildeten Mengen an Thiosulfat und Sulfit wurden quantifiziert und deren prozentuale Anteile an der Oxygenaseaktivität ermittelt (Abb. 18).

Die gemessene Oxygenaseaktivität sank deutlich von 282 mU/mg bei pH 7 und auf 15,7 mU/mg bei pH 4 ab. Gleichzeitig verringerte sich die Menge an nachgewiesenem Thiosulfat gegenüber der produzierten Sulfitmenge. Der prozentuale Anteil von gebildetem Thiosulfat an der Oxygenaseaktivität betrug bei pH 7 noch 76,4 %, verringerte sich bei pH 6 auf 62,8 % und 21,8 % bei pH 5. Korrelierend hierzu stieg der prozentuale Anteil des gebildeten Sulfits von 23,6 % bei pH 7, auf 37,2 % bei pH 6 und 78,2 % bei pH 5. Bei einem pH-Wert von 4 lag eine sehr geringe Gesamtaktivität vor und es wurde keinerlei Thiosulfat detektiert, sondern ausschließlich Sulfit als Produkt der Oxygenasereaktion nachgewiesen.



**Abbildung 18:** (A) Spezifische Aktivität der AaSOR bei 30 °C und verschiedenen pH Werten. Dargestellt sind Reduktase- und Oxygenaseaktivität sowie deren Aufspaltung in Thiosulfat- und Sulfitbildung. (B) Prozentualer Anteil der Thiosulfat- und Sulfitbildung an der Oxygenaseaktivität. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten in Triplikaten.

Ein weiteres Kontrollexperiment wurde durchgeführt, um einen durch den pH-Wert bedingten Thiosulfatabbau auszuschließen. Hierbei wird bei niedrigen pH-Werten Thiosulfat zu Schwefel und Sulfit degradiert, wobei schrittweise eine Schwefelkette aufgebaut wird, gefolgt von einem Ringschluss via intramolekularer S<sub>N</sub>2-Reaktion (Bartlett *et al.*, 1961). Diese Reaktion findet für gewöhnlich bei pH-Werten < 3 statt. Dennoch wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, um diesen Typ von nichtenzymatischer Reaktion ausschließen zu können. Hierzu wurden 200 nmol Thiosulfat in 500 µL Citrat-Phosphat-Enzymtestpuffer bei 30 °C für 50 min bei pH 4 - 7 inkubiert und die Menge an Thiosulfat über den Inkubationszeitraum quantifiziert (Abb. 19).



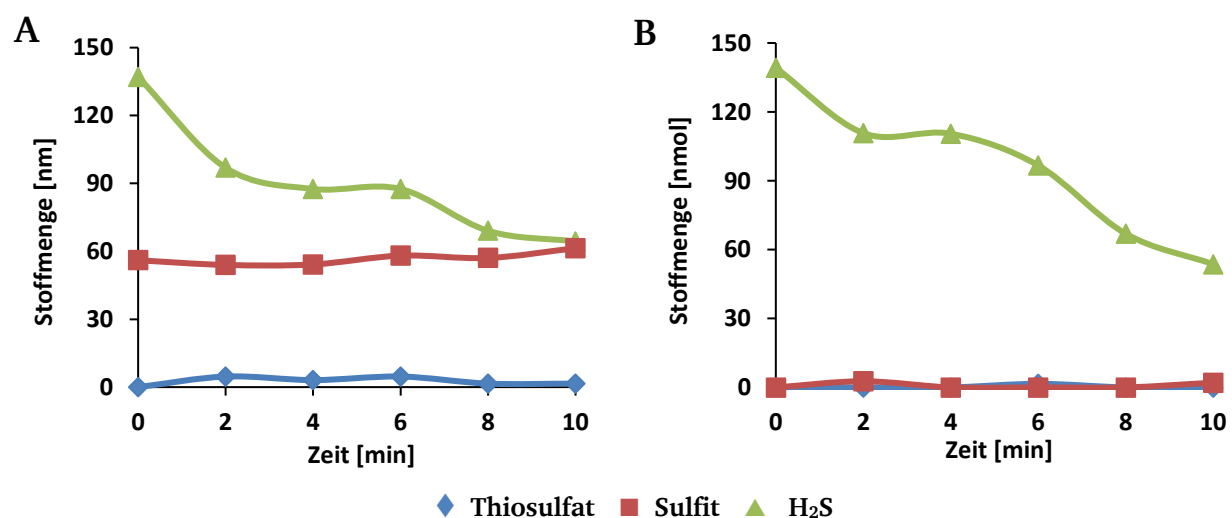
**Abbildung 19:** Kontrollexperiment zum Thiosulfatabbau im SOR-Aktivitätstest bei 30 °C in Abhängigkeit des pH-Wertes über 50 min Inkubationszeit ohne Enzymzugabe. Thiosulfatabbau (A) zu Sulfit (B) und Schwefel mit 200 nmol Thiosulfat im SOR-Testpuffer.

Bei keinem der im pH-Aktivitätstest der AaSOR bei 30 °C verwendeten pH-Werte wurde eine Degradation von Thiosulfat beobachtet. Die Thiosulfatkonzentration blieb über den gesamten

Inkubationszeitraum konstant. Ebenso wurde keine Sulfitbildung im Kontrollexperiment nachgewiesen.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob das Ungleichgewicht der Reaktionsprodukte von Oxygenase- und Reduktasereaktion auf einer nichtenzymatischen Reaktion beruht. In Gegenwart von komplexiertem Zink im Reaktionspuffer, zur Vermeidung der Zinkinhibition und zur Fällung des produzierten  $\text{H}_2\text{S}$ , wurde bereits eine annähernde 1:1 Stöchiometrie der Reaktionsprodukte beobachtet. Bei vergangenen Aktivitätsbestimmungen von AaSOR-Wt und derer Mutanten zeigten sich die Produktstöchiometrien jedoch durchaus variabel. Es wird angenommen, dass die schnelle nichtenzymatische Reoxidation des  $\text{H}_2\text{S}$  unter aeroben Bedingungen und dessen Flüchtigkeit bei hohen Temperaturen für das Ungleichgewicht der quantifizierten Reaktionsprodukte verantwortlich ist (Kletzin, 1989, 2008; Kletzin *et al.*, 2004; Urich *et al.*, 2004; Veith *et al.*, 2011a). Das Verhältnis der oxidierten zu den reduzierten Produkten liegt im oben abgebildeten Temperaturprofil bei ca. 4:1 unter optimalen Reaktionsbedingungen. Eine weitere Erklärung für dieses Ungleichgewicht der Produkte könnte jedoch eine nichtenzymatische Produktion von Thiosulfat aus Sulfit und Sulfid sein, die bei neutralem bis basischen pH-Wert stattfindet. Dabei reagiert Sulfid mit Sulfit unter Bildung von elementarem Schwefel als Intermediat, der wiederum mit Sulfit zu Thiosulfat reagieren kann (Heunisch, 1977).

Zur Überprüfung, ob das Ungleichgewicht der Reaktionsprodukte von Oxygenase- und Reduktasereaktion auf dieser nichtenzymatischen Reaktion beruht, wurde eine Kontrollmessung bei 85°C mit 60 nmol Natriumsulfit und 150 nmol Ammoniumsulfid in einem Zeitraum von 10 min ohne Enzymzugabe in 500  $\mu\text{L}$  SOR-Enzymtestpuffer bei pH 7,2 durchgeführt (Abb. 20). Um eine nichtenzymatische Reaktion von Sulfit mit elementarem Schwefel zu Thiosulfat zu vermeiden, wurde dem SOR-Testpuffer kein Schwefel zugesetzt.

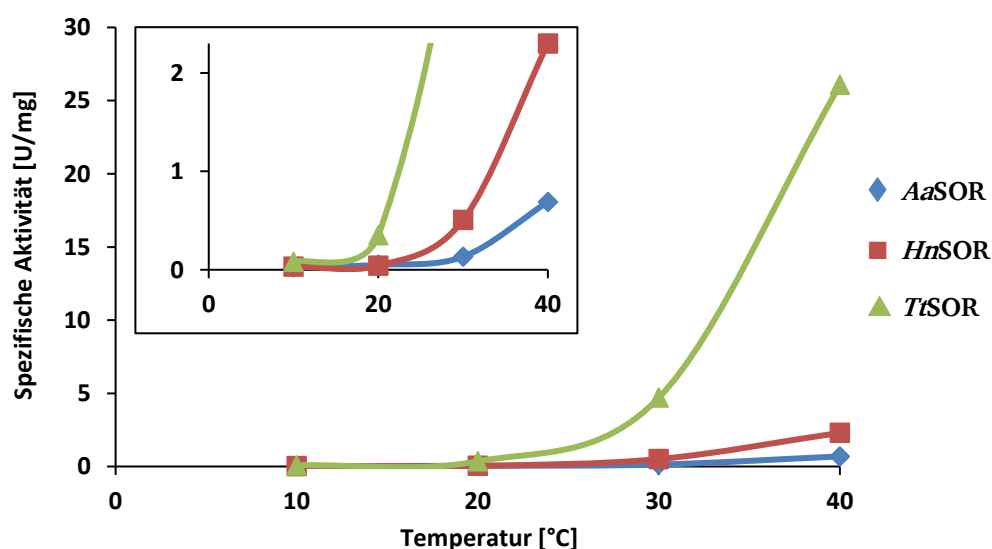


**Abbildung 20:** (A) Kontrollreaktion zur nichtenzymatischen Thiosulfatbildung aus Sulfit (60 nmol) und Schwefelwasserstoff (150 nmol) in 500  $\mu\text{L}$  SOR-Testpuffer ohne Schwefel- und Enzymzugabe. (B) Kontrollversuch ohne Sulfit zur Abnahme der in der Kontrollreaktion eingesetzten Ammoniumsulfidmenge im Reaktionspuffer.

Bei der Kontrollreaktion wurde keine signifikante Thiosulfatbildung nachgewiesen. Auch die Ausgangsmenge an Natriumsulfit blieb über den gesamten Inkubationszeitraum konstant. Jedoch wurde eine deutliche Verringerung der eingesetzten Ammoniumsulfidmenge auf 64 nmol im Testansatz festgestellt. Die Abnahme deckt sich mit der Reduktion der Stoffmenge des eingesetzten Ammoniumsulfids im Kontrollexperiment, bedingt durch die erhöhte Temperatur und Reoxidation (Abb. 20 B). Hier wurden 150 nmol Ammoniumsulfid über einen Zeitraum von 10 min bei 85 °C inkubiert, um die Flüchtigkeit von H<sub>2</sub>S unter den genutzten Reaktionsbedingungen zu simulieren. Die hier nachweisbare Sulfidmenge reduzierte sich auf 53 nmol. Eine Thiosulfatbildung aus Sulfit und Sulfid wurde nicht beobachtet.

### 4.3. Diskussion

Das bislang angenommene Aktivitätsspektrum der AaSOR erstreckte sich in einem Temperaturbereich von 50 - 108 °C mit einer maximalen Aktivität von 10,6 U/mg bei einem Temperaturoptimum von 85 °C (Kletzin, 1989). Durch Optimierung des SOR-Aktivitätstests und der Produktnachweisreaktionen konnte die maximal ermittelte Aktivität auf 32,7 U/mg erhöht werden. Zudem war es möglich, die Aktivität bis hinab zu einer Temperatur von 10 °C zu quantifizieren. Eine Aktivität in diesem Temperaturbereich galt bislang als besondere Anpassung der SORs mesophiler Mikroorganismen an diese Umweltbedingungen. So wurde für die beiden bereits charakterisierten SORs aus den mesophilen Organismen *H. neapolitanus* (HnSOR) und *T. thiocyanoxidans* (TtSOR) eine Aktivität ab einer Temperatur von 10 °C nachgewiesen. Beide SORs waren bis über 90 °C aktiv, mit maximalen Oxygenaseaktivitäten von 42 U/mg (HnSOR) und 208 U/mg (TtSOR) bei ihren Temperaturoptima von 80 °C.



**Abbildung 21:** Temperaturprofil von AaSOR, HnSOR (Veith, 2011a) und TtSOR (Rühl, 2015) zwischen 10 und 40 °C bezogen auf die Oxygenaseaktivitäten. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung des niedrigen Aktivitätsbereichs.



---

Abbildung 21 zeigt einen Auszug der spezifischen Oxygenaseaktivitäten von *AaSOR*, *HnSOR* und *TtSOR* im Temperaturbereich von 10 - 40 °C. Aufgrund der sehr geringen Reduktaseaktivität der *TtSOR* wurde diese nicht mit einbezogen. Bei 30 und 40 °C wurde bei der *TtSOR* eine vielfach höhere spezifische Oxygenaseaktivität nachgewiesen als bei *HnSOR* und *AaSOR*. Die Oxygenaseaktivitäten der *HnSOR* bei 30 und 40 °C überstiegen die der *AaSOR* um das Drei- bis Vierfache. Im Bereich zwischen 10 und 20 °C unterschieden sich die gemessenen Aktivitäten der drei SORs nur geringfügig (Veith *et al.*, 2012; Rühl, 2015). Aufgrund der erstmals nachgewiesenen Aktivität der *AaSOR* zwischen 50 - 10 °C kann eine Aktivität in diesem unteren Temperaturbereich nicht länger als spezielle Anpassung an mesophile Habitate angesehen werden.

Die detektierbaren Produkte der sauerstoffabhängigen Schwefeldisproportionierungsreaktion der SORs sind Sulfit, Thiosulfat und Schwefelwasserstoff. Nach Kontrollexperimenten wurde vermutet, dass Thiosulfat lediglich durch eine nichtenzymatische Reaktion zwischen Sulfit und elementarem Schwefel bei hohen Temperaturen gebildet wird. Bei der Erstellung eines Temperaturprofils der *HnSOR* wurden jedoch auch bei niedrigen Temperaturen (10 - 40 °C) beide Oxygenaseprodukte nachgewiesen (Veith *et al.*, 2012). Daher war lange unklar, ob Thiosulfat ein primäres Produkt der SOR oder lediglich ein sekundäres Reaktionsprodukt aus der nichtenzymatischen Reaktion darstellt, die bei erhöhten Temperaturen und einem pH-Wert  $\text{pH} \geq 5$  stattfindet. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Temperatur und pH-Wert für die SOR-Reaktion erniedrigt, um die Reaktionsprodukte der SOR ohne Auftreten der chemischen Thiosulfatbildung zu quantifizieren. Die Kontrollexperimente zeigten, dass bei einer Temperatur von 30 °C die Menge an nichtenzymatisch gebildetem Thiosulfat mit sinkendem pH-Wert geringer wird. Bei einem pH-Wert von 4 fand keine nichtenzymatische Reaktion mehr statt und es wurde keine Thiosulfatbildung festgestellt. Auch in der SOR-Reaktion wurde bei sinkendem pH-Wert weniger Thiosulfat im Verhältnis zum gebildeten Sulfit detektiert, bis bei pH 4 keine Thiosulfatbildung im SOR-Aktivitätstest mehr nachgewiesen wurde. Ein Thiosulfatabbau als Folge des niedrigen pH-Wertes fand nicht statt. In einer dritten Kontrollreaktion wurde überprüft, ob eine mögliche Thiosulfatbildung aus Sulfit und Sulfid bei neutralem pH-Wert die Ursache für die ungleiche Stöchiometrie zwischen den Produkten der Oxygenase - und Reduktasereaktion sein kann. Die Reaktion wurde unter den optimalen Reaktionsbedingungen für die *AaSOR* durchgeführt, es konnte jedoch kein Anzeichen für eine Thiosulfatbildung unter diesen Parametern gefunden werden. Der Grund für die ungleichen und oft variablen Produktstöchiometrien bleibt somit weiterhin unklar.

Die Resultate der hier beschriebenen Experimente belegen in ihrer Gesamtheit, dass Sulfit und Schwefelwasserstoff die primären Reaktionsprodukte der SOR darstellen und Thiosulfat lediglich als sekundäres Reaktionsprodukt durch die nichtenzymatische Reaktion von Sulfit und  $\text{S}^0$  auftritt.

---

## 5. Neue Inhibitoren der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase

---

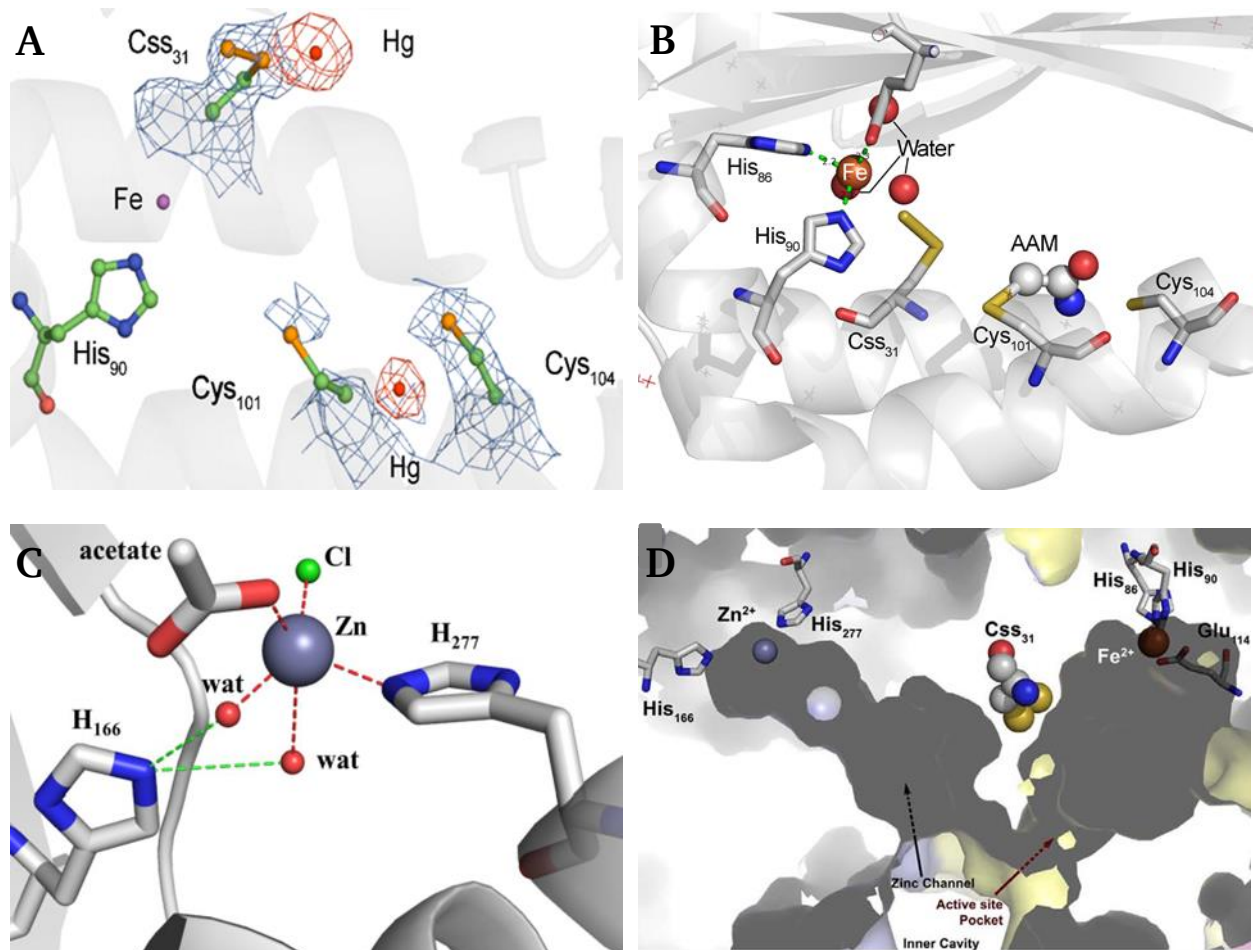
### 5.1. Einleitung

Im aktiven Zentrum der AaSOR sind drei hochkonservierte Cysteine lokalisiert, von denen C<sub>31</sub> eine essentielle Funktion für die Katalyse übernimmt. Mittels Röntgenstrukturanalysen war eine zusätzliche Elektronendichte am Schwefelatom dieses Cysteins entdeckt worden, was auf eine Persulfurierung der Aminosäure (R-S-S-H) hindeutet. Aufgrund der essentiellen Funktion und der beobachteten Modifikation wurde postuliert, dass CSS<sub>31</sub> die Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum darstellt (Urich *et al.*, 2005a; 2006).

Zur Verifizierung dieser These und Identifikation anderer Aminosäuren, die eine wichtige Rolle für die Katalyse spielen könnten, waren bereits in der Vergangenheit Inhibitoren eingesetzt und deren Bindungsstellen über Röntgenstrukturanalysen bestimmt worden. Das Spektrum an verfügbaren SOR-Inhibitoren war bislang jedoch sehr limitiert. Näher charakterisiert wurden bislang die beiden Schwermetalle Quecksilber (Hg<sup>2+</sup>) und Zink (Zn<sup>2+</sup>) sowie die häufig zur Blockierung von Thiolgruppen verwendete Verbindung Iodacetamid (IAA) (Veith *et al.*, 2011b). Auch N-Ethylmaleinimid (NEMI) und weitere Übergangsmetalle zeigten bei externer Zugabe im Enzymtest einen inhibitorischen Effekt auf das Enzym (Kletzin, 1989). Für Hg<sup>2+</sup> wurde eine zusätzliche Elektronendichte am Sy-Atom von CSS<sub>31</sub> und zwischen den beiden nicht-essentiellen Cysteinen mit räumlicher Nähe zum Sy-Atom von C<sub>101</sub> nachgewiesen (Abb. 22 A). Interessanterweise ist die Zn<sup>2+</sup>-Bindungsstelle nicht im aktiven Zentrum, sondern in einem blind endenden Kanal lokalisiert, wo Zn<sup>2+</sup> von H<sub>277</sub> und indirekt von H<sub>186</sub> koordiniert wird. Dieser Tunnel grenzt an das CSS<sub>31</sub> der Nachbaruntereinheit an, weshalb eine Einschränkung der Proteinbewegungen während der Katalyse als potentieller Inhibitionsmechanismus vermutet wird (Veith *et al.*, 2011b). Hierdurch werden möglicherweise Substrateingang und Produktausgang blockiert und/oder das essentielle CSS<sub>31</sub> in seiner Flexibilität eingeschränkt (Abb. 22 C+D). Für IAA wurde eine Bindung der Acetamid-Gruppe an das nichtessentielle C<sub>101</sub> anstelle des essentiellen CSS<sub>31</sub> nachgewiesen, jedoch nur in drei von sechs Monomeren der asymmetrischen Einheit (Abb. 22 B; Veith *et al.*, 2011b). In Experimenten, bei denen AaSOR-Kristalle mit diversen löslichen, anorganischen Schwefelverbindungen inkubiert worden waren, konnten bislang keine zusätzlichen Elektronendichten nachgewiesen werden. Der Nachweis von Reaktionsintermediaten oder einer direkten Substratbindung an das Eisenatom gelang bislang nicht. Möglicherweise weil die Substrat- oder Produktbindung nur in einem geringfügigen Anteil aller Untereinheiten stattfindet und damit nicht in der Kristallstruktur sichtbar ist (Urich, 2005c; Veith *et al.*, 2011a; 2011b).

Zur Identifikation von Substrat- und Produktbindungsstellen und dem Nachweis von Reaktionsintermediaten sollten neue Inhibitoren identifiziert und charakterisiert werden. Hierzu

wurde der inhibitorische Effekt von kleinen, organischen, schwefelhaltigen Molekülen und Oligosulfid-Verbindungen untersucht, die als Substratanaloga fungieren könnten. Weiterführend wurden stabile SOR-Inhibitor-Komplexe von vielversprechenden Verbindungen isoliert und kristallisiert, mit dem Ziel, potentielle Addukte und Bindungsstellen durch Röntgenstrukturanalysen nachzuweisen.

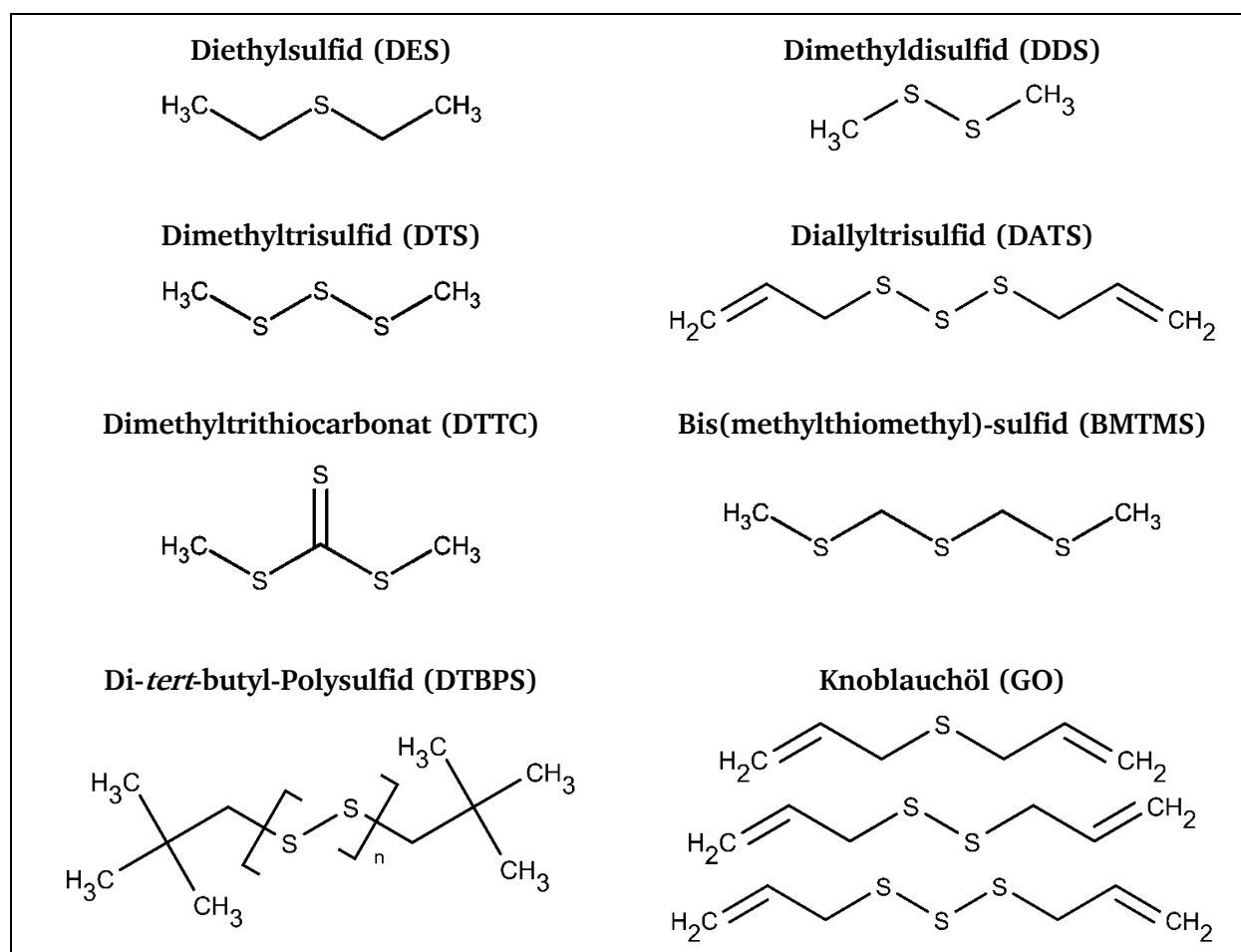


**Abbildung 22:** Bindungsstellen verschiedener Inhibitoren in den zugehörigen Kristallstrukturen der AaSOR. (A) Lokalisation und Elektronendichte von Quecksilber (rote Kugeln) im aktiven Zentrum an CSS<sub>31</sub> und zwischen C<sub>101</sub> und C<sub>104</sub> sowie Darstellung des Eisenzentrums (lila Kugel) und H<sub>90</sub> als einem der zugehörigen Liganden. (B) IAA-Bindungsstelle im aktiven Zentrum mit zugehörigem Acetamid-Addukt (AAM) an C<sub>101</sub> sowie die Darstellung des Eisenzentrums (orangene Kugel), den zugehörigen Wasser- (rote Kugeln) und Aminosäureliganden. (C) Zink-Bindungsstelle. Zn<sup>2+</sup> (graue Kugel) wird von einem Acetatmolekül, 2 Wassermolekülen (rote Kugeln), einem Chlorid-Ion (grüne Kugel) und H<sub>277</sub> koordiniert (rote gestrichelte Linien). Grüne gestrichelte Linien repräsentieren die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen H<sub>166</sub> und den Zink-koordinierenden Wassermolekülen. (D) Oberflächendarstellung zweier benachbarter Untereinheiten (schwach blau und gelb) mit hervorgehobener Zink-Bindestelle, Eisen-Zentrum mit zugehörigen Liganden sowie dem persulfurierten C<sub>31</sub>. Die Zink-Bindungsstelle ist am Ende eines Tunnels lokalisiert, der zu CSS<sub>31</sub> der benachbarten Untereinheit führt (nach Veith *et al.*, 2011a; 2011b).

## 5.2. Ergebnisse

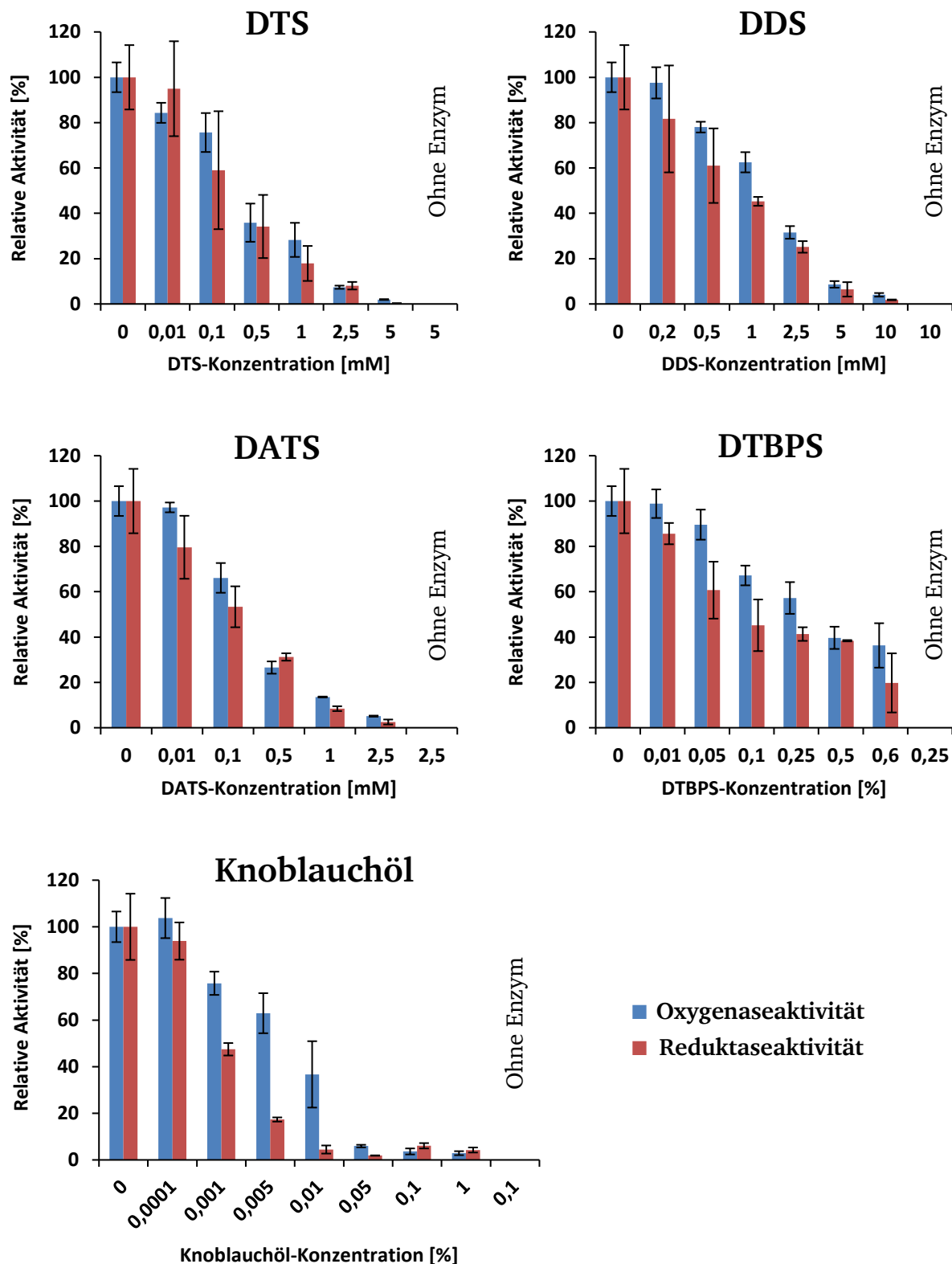
### 5.2.1. Identifikation neuer Inhibitoren für die Schwefel-Oxygenase/-Reduktase

Zur Erweiterung des limitierten Spektrums bekannter SOR-Inhibitoren wurde in dieser Arbeit nach kleinen, organischen Schwefelverbindungen gesucht, die einen inhibitorischen Effekt auf die SOR ausüben können. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf organischen Oligosulfidverbindungen, die als Substratanaloga fungieren könnten. Das Inhibitor-Screening umfasste die Verbindungen Diallyltrisulfid (DATS), Dimethyldisulfid (DDS), Dimethyltrisulfid (DTS), Diethylsulfid (DES), Dimethyltrithiocarbonat (DTTC), Bis(methylthiomethyl)-sulfid (BMTMS), Di-*tert*-butyl-Polysulfid (DTBPS) und artifizielles Knoblauchöl (GO), ein Gemisch, das vor allem aus Diallyldisulfid, Diallyltrisulfid und Allylsulfid besteht (Abb. 23).



**Abbildung 23:** Strukturformeln aller organischen Schwefelverbindungen, die in den Inhibitor-Assays zum Einsatz kamen.

Zur Untersuchung des inhibitorischen Effekts dieser Schwefelverbindungen auf die AaSOR wurden die Substanzen in fünf bis sieben unterschiedlichen Konzentrationen dem Enzymtest zugegeben und die enzymatische Aktivität im Vergleich zu einer nicht-inhibierte SOR-Reaktion ermittelt (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Inhibitor-Assays mit den organischen Schwefelverbindungen Dimethyltrisulfid (DTS), Dimethyldisulfid (DDS), Diallyltrisulfid (DATS), Di-*tert*-butyl-Polysulfid (DTBPS) und Knoblauchöl als artifizielle Mischung verschiedener Schwefelverbindungen. Dargestellt sind die relativen Aktivitäten der AaSOR in Gegenwart definierter Inhibitorkonzentrationen, unterteilt in Oxygenaseaktivität und Reduktaseaktivität. Die mittlere spezifische Aktivität der nicht-inhibierten SOR-Reaktion betrug  $117,3 \pm 14,5$  U/mg (Ox.) und  $7,7 \pm 2,1$  U/mg (Red.) in Citrat-Phosphat-Enzymtestpuffer und wurde als 100 % relative Aktivität definiert. Die letzte Spalte repräsentiert jeweils eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Enzym bei einer ausgewählten Inhibitorkonzentration. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten in Triplikaten.

---

Für DES, DTTC und BMTMS wurde selbst bei Konzentrationen von 10 - 100 mM keine signifikante Inhibition beobachtet, weshalb diese Verbindungen nicht für weitere Versuche herangezogen wurden. Eine deutliche Abnahme der Aktivitäten bei steigenden Inhibitorkonzentrationen wurde für DDS, DTS, DATS, DTBPS und GO nachgewiesen. Die niedrigste Konzentration mit einem messbaren Effekt betrug bei DTS 0,01 mM mit einer Restaktivität von 84,3 % für die Oxygenase- und 94,9 % für die Reduktaseaktivität in Bezug auf die nicht-inhibierte SOR-Reaktion. Bei einer Konzentration von 5 mM DTS betrug die Oxygenaseaktivität nur noch 1,9 % und die Reduktaseaktivität 0,2 %. DATS bewirkte eine vergleichbare Inhibition bereits mit 2,5 mM. Für einen entsprechenden Effekt war für DDS eine Zugabe von 10 mM nötig. Eine erste Inhibition wurde durch DDS erst bei Zugabe von 0,2 mM dieser Verbindung festgestellt. Die relativen Aktivitäten in Gegenwart von DTBPS konnten lediglich bis zu einer Konzentration von 0,6 % [v/v] ermittelt werden. Bei höheren Inhibitorkonzentrationen trat eine Trübung des Reaktionsansatzes nach dem Erhitzen auf, was eine kolorimetrische Produktbestimmung unmöglich machte. So reduzierte sich die enzymatische Aktivität bei Zugabe von 0,6 % [v/v] DTBPS auf 36,1 % (Ox) und 19,8 % (Red). Die niedrigste Konzentration mit nachweisbarem inhibitorischen Effekt betrug 0,01 % [v/v] DTBPS. Hingegen war bei der Verwendung von Knoblauchöl bereits zwischen 0,0001 und 0,001 % [v/v] eine erste Inhibition zu erkennen und mit 0,05 % fand bereits eine fast vollständige Inhibition statt.

Anhand der prozentualen Inhibition wurden Inhibitionskurven angefertigt, mit deren Hilfe die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) der Inhibitoren kalkuliert wurde (Tab. 8). Dabei wiesen DATS und GO mit 0,16 mM und 0,004 % [v/v] für die Oxygenase- bzw. 0,09 mM und 0,001% [v/v] für die Reduktaseaktivität die niedrigsten  $IC_{50}$ -Werte und somit den stärksten inhibitorischen Effekt auf. Die mittlere inhibitorische Konzentration von DTS lag nur geringfügig höher als die von DATS. Das eingesetzte artifizielle Knoblauchöl setzt sich laut Herstellerangaben aus 10 - 13 % [w/w] Diallyltrisulfid, 30 - 50 % [w/w] Diallyldisulfid und 5 - 13 % [w/w] Allylsulfid zusammen. Bezogen auf den  $IC_{50}$ -Wert der Oxygenaseaktivität von 0,004 % [v/v] entspricht dies durchschnittlich Konzentrationen von etwa 0,12 mM Diallyldisulfid, 27,6  $\mu$ M DATS und 33,8  $\mu$ M Allylsulfid im Reaktionsansatz. Der inhibitorische Effekt scheint somit hauptsächlich durch Diallyldisulfid bewirkt zu werden, da für eine gleichstarke Inhibition eine fast sechsfach höhere DATS-Konzentration nötig wäre und Monosulfid-Verbindungen die enzymatische Aktivität vermutlich nicht beeinflussen. Der inhibitorische Effekt des Gemisches aus Di-*tert*-butyl-Polysulfiden war um das rund 70- (Ox.) bis 100-fache (Red.) geringer als der des Knoblauchöls. Bei DDS war der Einsatz einer acht- bis neunfach höheren Menge der Substanz nötig, um einen mit DATS vergleichbaren Effekt zu erzielen.

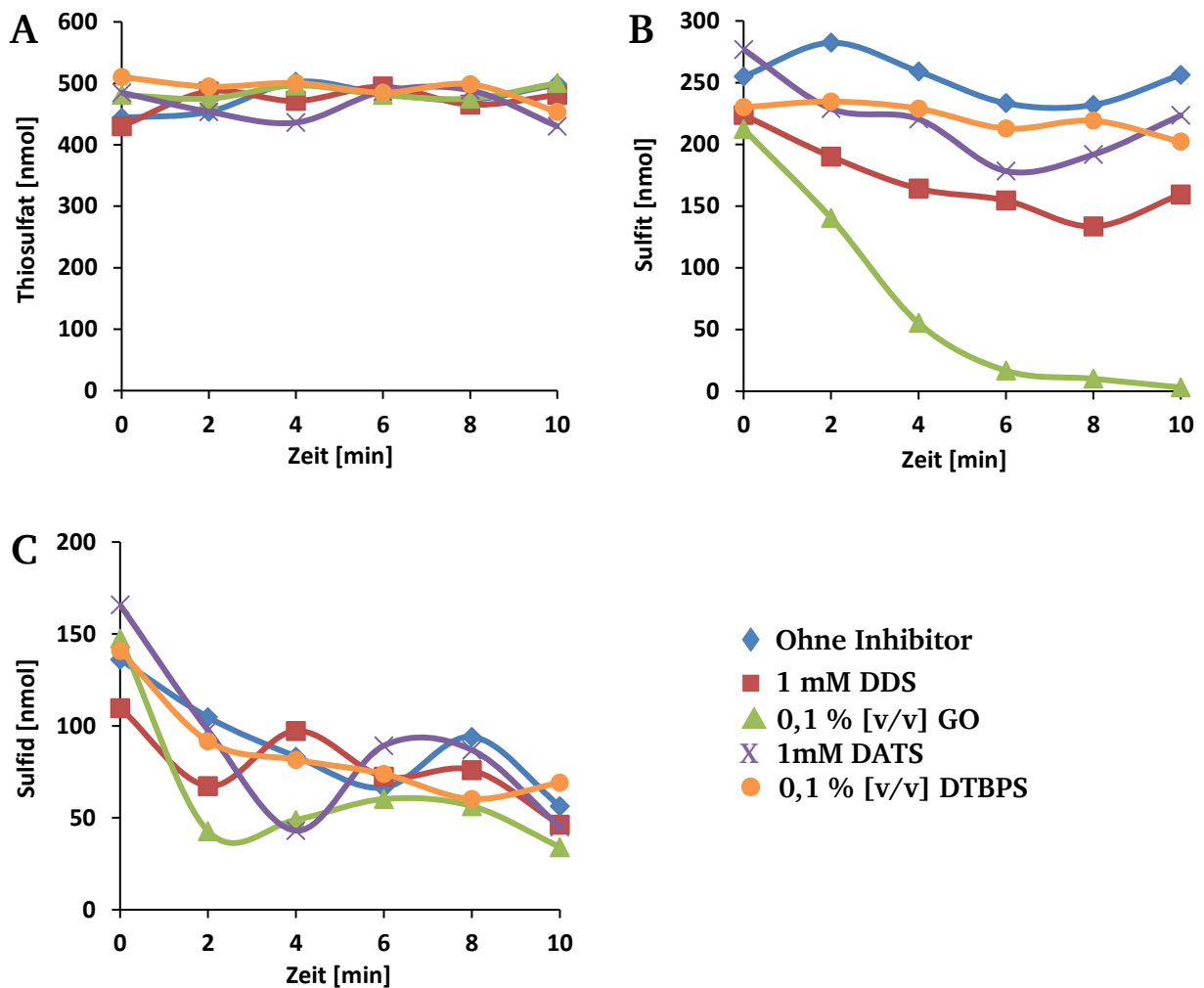


**Tabelle 8:** Übersicht der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>) der identifizierten Inhibitoren bezogen auf Oxygenase- und Reduktasereaktion der AaSOR.

Inhibitor	IC <sub>50</sub> (Oxygenase)	IC <sub>50</sub> (Reduktase)
Dimethyldisulfid	1,28 mM	0,82 mM
Dimethyltrisulfid	0,2 mM	0,17 mM
Diallyltrisulfid	0,16 mM	0,09 mM
Di- <i>tert</i> -butyl-Polysulfid	0,31 % [v/v]	0,11 % [v/v]
Knoblauchöl	0,004 % [v/v]	0,001 % [v/v]

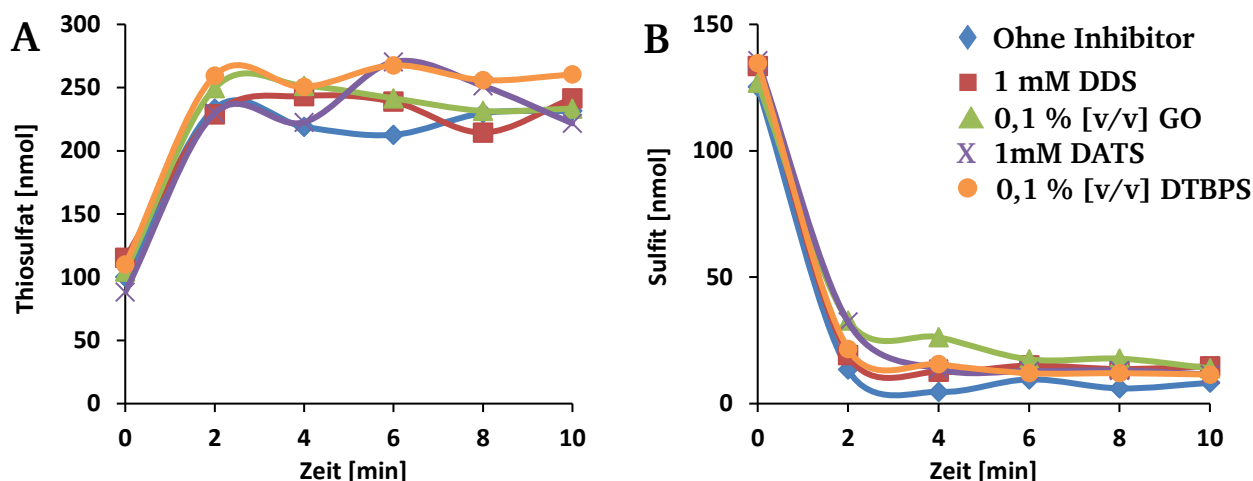
Um Kreuzreaktionen der verwendeten Inhibitoren mit Produkten der SOR-Reaktion als Ursache für die sinkende Enzymaktivität auszuschließen, wurden mehrere Kontrollversuche durchgeführt. Die Verbindung DTS wurde an dieser Stelle nicht weiter verfolgt, da Literaturrecherchen und spätere Versuche (Kap. 5.2.2) zeigten, dass DTS eine geringe chemische Stabilität besitzt und beim Erhitzen in ein unspezifisches Produktgemisch zerfällt (Pickerin *et al.*, 1967). Der beobachtete inhibitorische Effekt konnte somit nicht eindeutig auf DTS zurückgeführt werden.

Für die Kontrollexperimente wurden jeweils 500 nmol Natriumthiosulfat, 250 nmol Natriumsulfit oder 150 nmol Natriumsulfid in 500 µL SOR-Enzymtestpuffer gegeben, wobei für Natriumsulfit ein Puffer ohne elementaren Schwefel verwendet wurde. Die Ansätze wurden nach Zugabe der Inhibitoren (1 mM DDS, 1 mM DATS, 0,1 % [v/v] DTBPS oder 0,1 % [v/v] GO) für 10 min bei 85 °C inkubiert. Ein Ansatz ohne Inhibitor diente als Kontrolle. In Intervallen von 2 min wurden die Stoffmengen von Thiosulfat, Sulfit oder Sulfid quantifiziert (Abb. 25). Die Thiosulfat-Konzentration blieb bei allen getesteten Inhibitoren analog zur Kontrollreaktion über den Inkubationszeitraum konstant bei ca. 500 nmol/500 µL Testansatz. Bei DATS und DTBPS bewegten sich auch die Sulfit-Konzentrationen im Bereich der eingesetzten 250 nmol/500 µL Testansatz, wie auch die Referenz ohne Inhibitor. Die Zugabe von DDS bewirkte ein leichtes Absinken der nachweisbaren Sulfit-Menge über den Inkubationszeitraum auf ca. 150 nmol/500 µL Reaktionsansatz. Auch die Zugabe von GO resultierte in einer stetigen Reduktion der Sulfitmenge bis nach 10 min lediglich noch 3,0 nmol/500 µL Probenvolumen vorhanden waren. Die Kontrollreaktionen mit Natriumsulfid im Reaktionsansatz zeigten bei allen Inhibitoren und der Kontrolle einen ähnlichen Verlauf. Die Menge an Sulfid reduzierte sich über den Zeitraum von 10 min kontinuierlich von 150 nmol/500 µL auf eine Endkonzentration von etwa 50 nmol/500 µL. Bei GO war die Abnahme der Sulfidmenge in den ersten 2 min stärker als beim Rest.



**Abbildung 25:** Kontrollversuche zu Kreuzreaktionen der Inhibitoren mit den Produkten der SOR-Reaktion bei 85 °C. (A) 500 nmol Natriumthiosulfat in 500 µL SOR-Enzymtestpuffer. (B) 250 nmol Natriumsulfit in 500 µL SOR-Enzymtestpuffer ohne Schwefel. (C) 150 nmol Natriumsulfid in 500 µL SOR-Enzymtestpuffer.

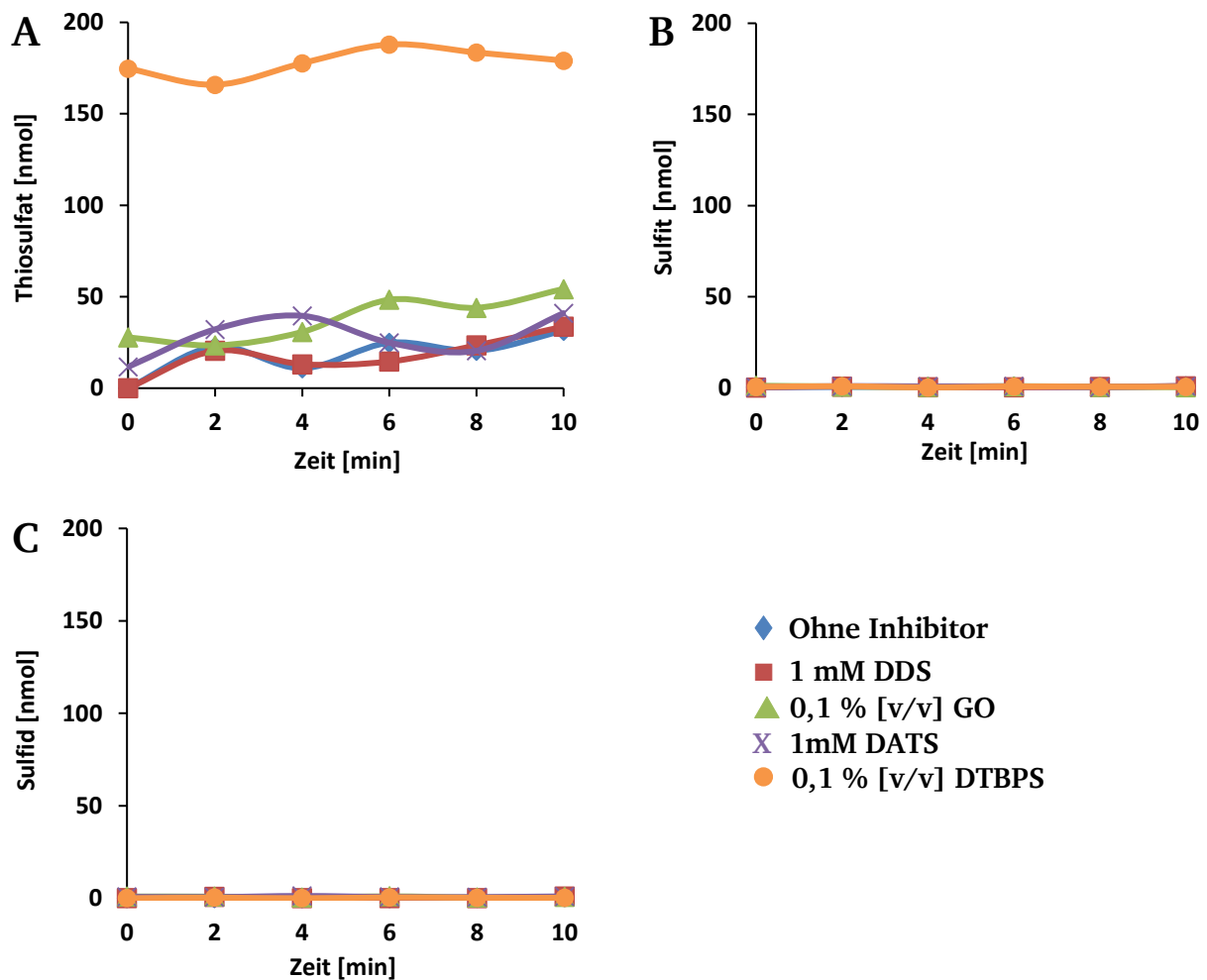
In einem weiteren Kontrollexperiment wurde untersucht, ob die beobachteten Kreuzreaktionen von DDS und GO mit Sulfit die Quantifizierung der Reaktionsprodukte in den Inhibitor-Assays beeinflussen und somit die Aktivitätsbestimmungen verfälschen. Bei den Reaktionsbedingungen im Enzymtest bei 85 °C wird durch die SOR gebildetes Sulfit mit elementarem Schwefel hauptsächlich in Thiosulfat umgesetzt. Daher wurde in schwefelhaltigem SOR-Enzymtestpuffer getestet, ob die nichtenzymatische Bildung von Thiosulfat schneller abläuft als die interferierenden Kreuzreaktionen mit DDS und GO (Abb. 26). In diesem Fall wären die beschriebenen Inhibitor-Sulfit-Interaktionen vernachlässigbar.



**Abbildung 26:** Kontrollversuche zur nicht-enzymatischen Thiosulfatbildung aus Sulfid und elementarem Schwefel in Gegenwart verschiedener Inhibitoren. 250 nmol Natriumsulfid wurden in 500  $\mu$ L SOR-Enzymtestpuffer bei 85 °C inkubiert und die Mengen an Thiosulfat (A) und Sulfid (B) quantifiziert.

Sowohl bei der Kontrolle als auch bei den Inhibitoren hat bereits vor der eigentlichen Inkubation bei 85 °C eine teilweise Umsetzung des eingesetzten Sulfids zu Thiosulfat stattgefunden. Bei allen Reaktionen wurden zum Startzeitpunkt ca. 100 nmol/500 $\mu$ L Thiosulfat gemessen. In der Kontrollreaktion erfolgte eine nahezu vollständige Umsetzung des Sulfids zu Thiosulfat. Nach der zehnmündigen Inkubationszeit wurden ca. 8 nmol Sulfid und 232 nmol Thiosulfat in 500  $\mu$ L Testpuffer detektiert. Auch in Gegenwart aller eingesetzten Inhibitoren fand eine vergleichbare nicht-enzymatische Thiosulfatbildung statt. Die kalkulierten Thiosulfatkonzentrationen in 500  $\mu$ L Testpuffer betrugen 221 - 260 nmol. Die Sulfidmenge bewegte sich im Bereich von 11 - 15 nmol/500  $\mu$ L. Eine durch DDS oder GO bedingte Reduktion der Sulfid-Konzentration ohne nicht-enzymatische Umsetzung mit elementarem Schwefel zu Thiosulfat wurde nicht beobachtet. In einem abschließenden Kontrollexperiment wurde untersucht, ob die verwendeten Inhibitoren im Enzymtest mit den Nachweisreaktionen interferieren oder durch Reaktion mit elementarem Schwefel nachweisbare Produkte entstehen. Die jeweiligen Inhibitoren wurden für 10 min in 500  $\mu$ L SOR-Enzymtestpuffer bei 85 °C inkubiert, die Reaktionsansätze auf Anwesenheit von Thiosulfat, Sulfid und Sulfid überprüft und mit einer Kontrollreaktion ohne Inhibitor verglichen (Abb. 27). Wie bei der Kontrollreaktion wurde für keinen der mit Inhibitoren versetzten Reaktionsansätze eine Interferenz mit den Nachweismethoden für Sulfid oder Sulfid beobachtet. Über den gesamten Inkubationszeitraum wurden weder Sulfid noch Sulfid nachgewiesen. Anders verhielt es sich bei der Thiosulfat-Nachweisreaktion. Mit DTBPS im Reaktionsansatz wurden zu allen Messzeitpunkten rund 180 nmol Thiosulfat in den 500  $\mu$ L Enzymtestpuffer nachgewiesen bzw. eine entsprechende Entfärbung des Methylenblaus bewirkt. In der Kontrollreaktion wurde über den Inkubationszeitraum eine leichte Entfärbung als Hintergrundreaktion bewirkt. Die entsprechende Verfärbung in Gegenwart von DDS, DATS und GO bewegte sich auf einem zur

Kontrolle vergleichbaren Niveau. DATS bewirkte bereits beim nicht erhitzten Startwert eine leichte Entfärbung, die etwa 30 nmol Thiosulfat im 500  $\mu$ L Testansatz entsprach.



**Abbildung 27:** Kontrollversuche zur möglichen Interferenz der Inhibitoren mit den Nachweisreaktionen für Thiosulfat (A), Sulfit (B) und Sulfid (C). Die Inhibitoren wurden in 500  $\mu$ L SOR-Enzymtestpuffer mit elementarem Schwefel bei 85 °C inkubiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Di- und Oligosulfidverbindungen Dimethyldisulfid (DDS), Diallyltrisulfid (DATS), Di-*tert*-butyl-Polysulfid (DTBPS) und artifizielles Knoblauchöl (GO) einen inhibitorischen Effekt auf die SOR ausüben und die reduzierten Enzymaktivitäten nicht das Resultat einer Interferenz der getesteten Verbindungen mit den Nachweisreaktionen der Produktquantifizierung sind.

### 5.2.2. Untersuchung der Inhibitor-Bindungsstellen

Um Bindungsstellen und potentielle Inhibitoraddukte mittels Röntgenstrukturanalysen nachweisen zu können, mussten stabile SOR-Inhibitor-Komplexe präpariert werden. Hierfür erfolgte die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen in Vorversuchen (Tab. 9). Zu Beginn wurden 100  $\mu$ L isolierte AaSOR (1 mg/mL) zusammen mit dem jeweiligen Inhibitor bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Inhibitorkonzentration wurde gemäß der maximal beobachteten Inhibition gewählt (5 mM DTS, 10 mM DDS, 2,5 mM DATS, 0,1 % [v/v] GO oder 0,6 % [v/v] DTBPS). Anschließend erfolgte die Bestimmung der verbleibenden Enzymaktivität durch Zugabe von 2  $\mu$ g behandelter SOR in einem Enzymtest und der optischen Bewertung der Methylenblauentfärbung im Thiosulfatnachweis. Die Inkubation bei Raumtemperatur zeigte keinerlei inhibitorischen Effekt auf die SOR. Auch eine Inkubation bei 80 °C zeigte keine Aktivitätsverminderung. Erst die Zugabe einer Spatelspitze Schwefel zum Testansatz und eine 30 minütige Inkubation bei 80 °C bewirkten eine schwache Verminderung der Enzymaktivität. Bei Raumtemperatur hingegen zeigte die Inkubation zusammen mit Schwefel keinen Effekt. Die nach der Inkubation der SOR zusammen mit Schwefel beobachtete Inhibition war jedoch weitaus geringer, als die im Inhibitor-Assay bei gleicher Inhibitorkonzentration. Erst eine Erniedrigung der Enzymkonzentration auf  $\leq 5 \mu\text{g/mL}$  im Reaktionsansatz führte zu einer vollständigen Inhibition. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Protokoll zur Präparation der SOR-Inhibitor-Komplexe erstellt.

**Tabelle 9:** Überblick über die getesteten Inkubationsbedingungen der AaSOR zusammen mit Inhibitoren. 100  $\mu$ L gereinigter AaSOR mit einer Konzentration von 1 mg/mL wurden mit Inhibitor versetzt und nach Inkubation mit den aufgelisteten Bedingungen mittels Aktivitätstest auf eine Inhibition überprüft. Als Indikator wurde die Entfärbung von Methylenblau im Thiosulfatnachweis optisch bewertet. (-) starke Entfärbung/keine Inhibition, (+/-) mittelstarke Entfärbung/reduzierte Enzymaktivität, (++) keine Entfärbung/vollständige Inhibition.

	85°C	Schwefel RT	Schwefel 85 °C	Schwefel 85 °C Konz. $\leq 5 \mu\text{g/mL}$
<b>Inhibition</b>	-	-	+/-	++

Hierbei wurden 5 mg (DATS, DTBPS, GO) oder 10 mg (DDS) gereinigte AaSOR in 500/1000 mL schwefelhaltigem Citrat-Phosphat-Enzymtestpuffer für 30 min bei 80 °C mit dem jeweiligen Inhibitor (5 mM DTS, 10 mM DDS, 2,5 mM DATS, 0,1 % [v/v] GO oder 0,6 % [v/v] DTBPS) inkubiert. Der elementare Schwefel wurde anschließend durch Filtration entfernt. Nach einem Ultrazentrifugationsschritt erfolgten Reinigung und Aufkonzentrierung der inhibierten SORs mittels *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie, wobei nach Proteinbindung an die Säule ein 12 CV umfassender Waschschrift zur Entfernung freier Inhibitormoleküle durchgeführt wurde. Die Rückgewinnung variierte zwischen 76 % und 100 % (Tab. 10).

**Tabelle 10:** Überblick über die Konzentrationen und Gesamtproteinmengen der isolierten SOR-Inhibitor-Komplexe mit Angabe der prozentualen Rückgewinnung der eingesetzten Enzymmenge.

SOR-Inhibitor-Komplex	Konzentration [mg/mL]	Gesamtprotein [mg]	Rückgewinnung [%]
DDS-SOR	1,68	10,0	100
DTS-SOR	0,74	4,2	83
DATS-SOR	0,80	5,0	100
DTBPS-SOR	0,64	3,8	76
GO-SOR	0,62	4,3	86

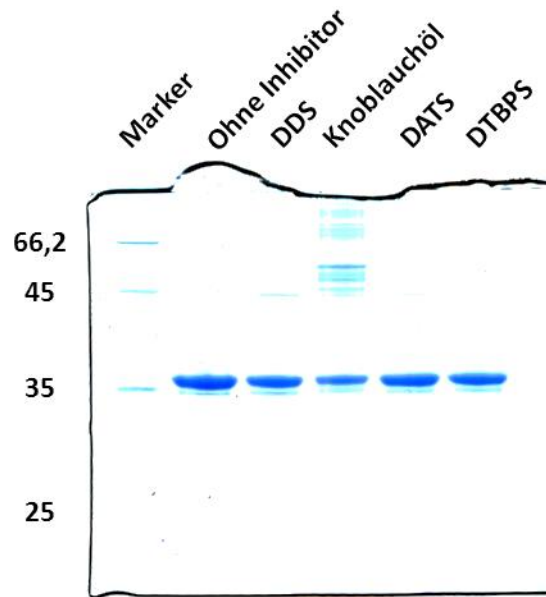
Der Erfolg der Behandlung wurde mittels Enzymtests verifiziert (Tab. 11). Die beste Inhibition wurde durch DDS erzielt, mit einer Restaktivität von 3,1 % (Ox) und 1,3 % (Red). Auch die Behandlung mit DTBPS bewirkte eine deutliche Reduktion der Enzymaktivität auf 4,2 % (Ox) und 3,72 % (Red). Für DTS konnte durch diese Behandlung keine Inhibition erreicht werden. Nach der Inkubation der SOR mit DTS bei 80 °C trat eine sichtbare Präzipitatbildung auf. Eine Inkubation mit DATS resultierte in einer Verminderung der Enzymaktivität auf 43,4 % (Ox) und 29,7 % (Red). Durch das artifizielle Knoblauchölgemisch fand eine Reduktion der Enzymaktivität auf 15,3 % (Ox) und 18,6 % (Red) statt.

**Tabelle 11:** Restaktivität der isolierten SOR-Inhibitor-Komplexe verglichen mit nicht-inhibierter AaSOR (Ox.: 159,3 U/mg, Red.: 7,9 U/mg), unterteilt in Oxygenase- und Reduktaseaktivität.

SOR-Inhibitor-Komplex	Restaktivität (Oxygenase)	Restaktivität (Reduktase)
DDS-SOR	3,1 %	1,3 %
DTS-SOR	100 %	100 %
DATS-SOR	43,4 %	29,7 %
DTBPS-SOR	4,2 %	3,7 %
GO-SOR	15,3 %	18,6 %

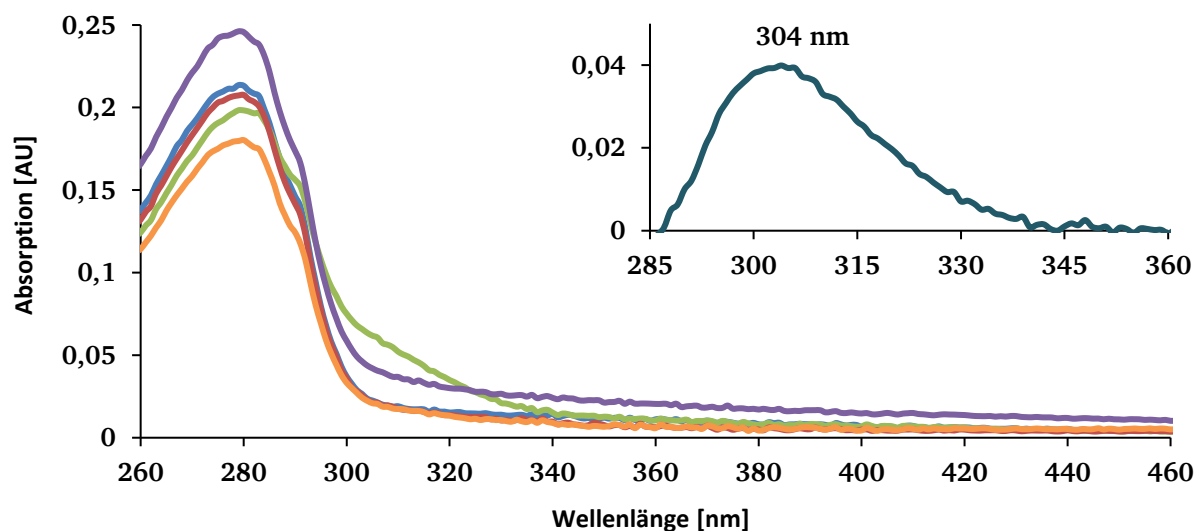
Das SDS-Gel der isolierten SOR-Inhibitor-Komplexe zeigte, dass ihre apparente molekulare Masse nach der Coomassie-Färbung mit den Monomeren der unbehandelten AaSOR mit ca. 36 kDa übereinstimmte (Abb. 28). DDS- und DATS-SOR wiesen zudem eine schwache Bande im Bereich von 45 kDa auf. Die Spur der mit Knoblauchöl behandelte SOR zeigte mehrere schwache Banden mit einer Masse von über 45 kDa auf. Diese Banden waren bis an den oberen Rand des SDS-Gels nachweisbar.

Durch UV/VIS-Spektroskopie wurde überprüft, ob eine Inhibitor-Bindung in den SOR-Inhibitor-Komplexen direkt durch Absorptionsänderungen in einem Absorptionsspektrum nachgewiesen werden können (Abb. 29).



**Abbildung 28:** Coomassie-gefärbtes 10 % SDS-Gel der gereinigten SOR-Inhibitor-Komplexe und der unbehandelten *AaSOR*. 5 µg Protein pro Spur, Marker *unstained* # 26610.

Das Spektrum der unbehandelten *AaSOR* zeigte ein Maximum bei 280 nm und eine Schulter bei ca. 290 nm. Im Wellenlängenbereich über 300 nm flachte das Spektrum stark ab. Die Spektren der SOR-Inhibitor-Komplexe verliefen annähernd deckungsgleich und wiesen lediglich Varianzen in der Absorptionsintensität auf. Im Spektrum der mit Knoblauchöl behandelten SOR wurde zudem eine zweite Schulter zwischen 300 und 330 nm nachgewiesen. Das Spektrum flachte in diesem Wellenlängenbereich deutlich schwächer ab, als bei den übrigen Komplexen und der



■ *AaSOR* ohne Inhibitor ■ *AaSOR* + DDS ■ *AaSOR* + GO ■ *AaSOR* + DATS ■ *AaSOR* + DTBPS

**Abbildung 29:** Auszug aus den UV/VIS-Spektren der SOR-Inhibitor-Komplexe im Wellenlängenbereich von 260-460 nm. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung des Bereichs zwischen 285 und 360 nm im Differenzspektrum von GO-SOR und der nicht-inhibierter *AaSOR*.



unbehandelten AaSOR. Eine Schulter im Bereich von 315 nm ist eines der typischen Merkmale für Eisen-Schwefel-Proteine und könnte auf eine Interaktion einer der im Knoblauchöl enthaltenen Verbindungen mit dem Eisenzentrum der SOR hindeuten (Curatti *et al.*, 2008). Das Differenzspektrum von GO-SOR und nicht-inhibierter AaSOR zeigt einen deutlichen Peak mit einem Maximum bei 304 nm.

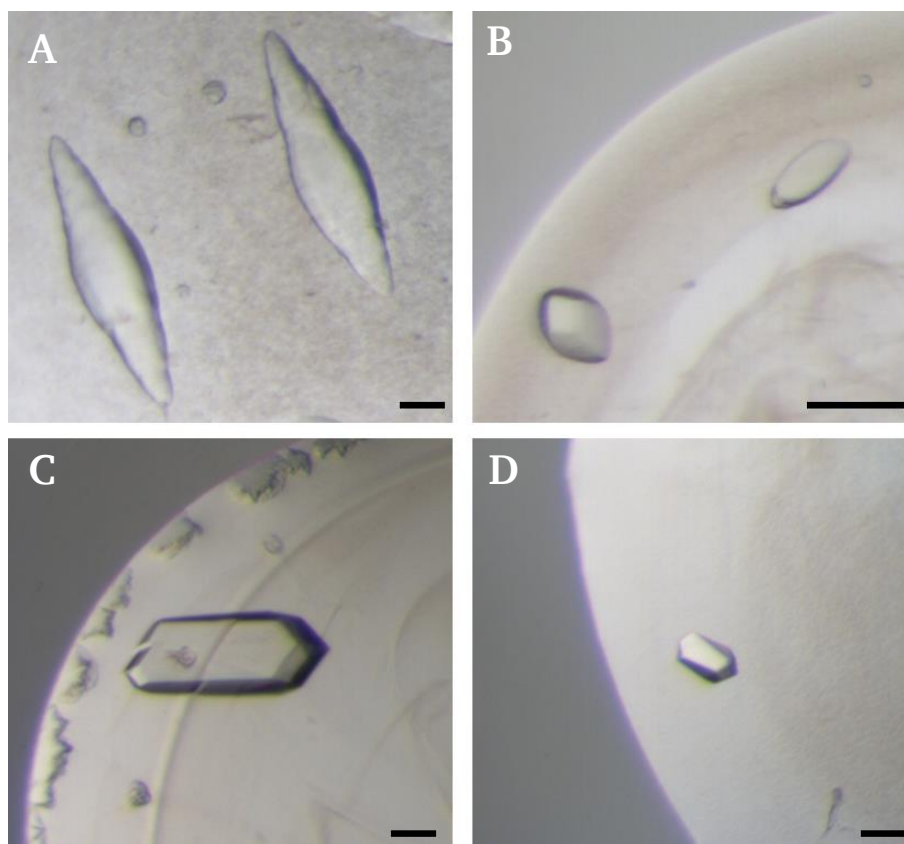
Als Vorbereitung für die Kristallisation wurden die SOR-Inhibitor-Komplexe gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert und auf Konzentrationen von 14,0 mg/mL (DDS-SOR), 13,7 mg/mL (DATS-SOR), 13,4 mg/mL (DTBPS-SOR) und 13,0 mg/mL (GO-SOR) eingestellt. Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde ein automatisiertes Kristallisations-Screening durchgeführt (siehe 3.7.1). Die Kristallisationsbedingungen wurden durch leichte Variation von pH-Wert und Konzentration des Präzipitationsmittels weiter optimiert (Tab. 12). Alle Kristallisationen erfolgten bei 20 °C.

**Tabelle 12:** Kristallisationsbedingungen und kryoprotektive Lösungen der SOR-Inhibitor-Komplexe

Protein	Kristallisationsbedingung	Kryoprotektive Lösung
<b>DATS-SOR</b>	0,1 M Natriumacetat pH 4,6 2,0 M Natriumformiat	0,1 M Natriumacetat pH 4,6 2,0 M Natriumformiat 35 % [v/v] Glycerin
<b>DDS-SOR</b>	0,1 M Natriumcacodylat pH 6,1 1,4 M Natriumacetat	0,1 M Natriumcacodylat pH 6,1 1,4 M Natriumacetat 30 % [v/v] Glycerin
<b>DTBPS-SOR</b>	0,1 M Natriumcitrat pH 5,6 1,0 M Ammoniumphosphat	0,1 M Natriumcitrat pH 5,6 1,0 M Ammoniumphosphat 30 % [v/v] Glycerin
<b>GO-SOR</b>	0,4 M Ammoniumphosphat	0,4 M Ammoniumphosphat 35 % [v/v] Glycerin

Für DDS- und DATS-SOR wurde eine erste Kristallbildung nach 24 h beobachtet. Nach einer Woche Inkubationszeit erreichten die spindelförmigen Kristalle der DDS-SOR eine maximale Größe von 0,6 mm und die ovalen Kristalle der DATS-SOR eine Größe von 0,05 mm. Für die DTBPS-SOR waren nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Wochen hexagonale Kristalle mit Größen zwischen 0,2 und 0,4 mm sichtbar. Das Konzentrat der GO-SOR präzipitierte teilweise während des Probenversands, wodurch sich die Kristallisierung erschwerte. Mit einer 0,4 M Ammoniumphosphat-Lösung konnte nach einer Inkubationszeit von 5 Wochen ein einzelner hexagonaler Kristall mit einer Größe von 0,05 mm erhalten werden. Ausgewählte Kristalle

(Abb. 30) wurden in eine an die Kristallisationslösung angepasste kryoprotektive Lösung (Tab. 12) transferiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und für die finale Synchrotron-Bestrahlung gelagert.



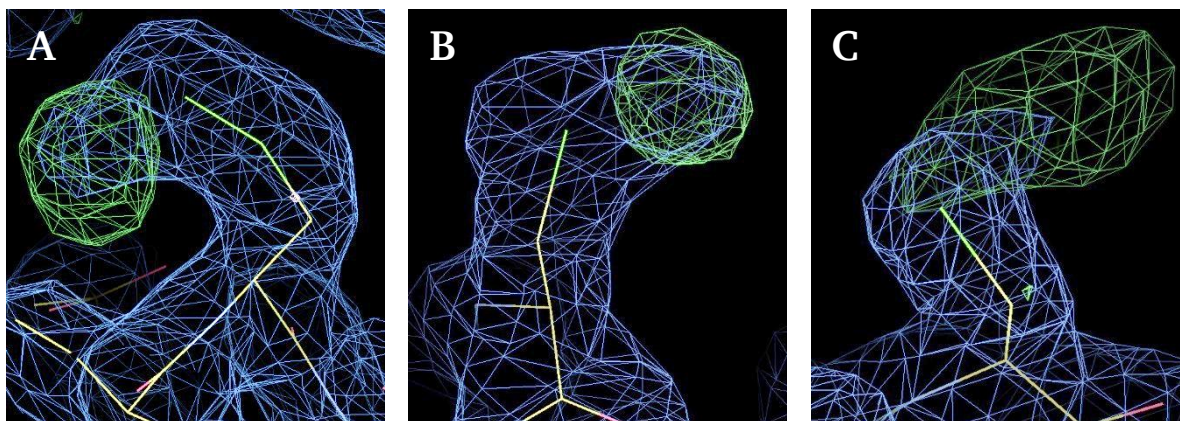
**Abbildung 30:** Kristalle der SOR-Inhibitor-Komplexe. **(A)** DDS-SOR kristallisiert in 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,1 / 1,4 M Natriumacetat. **(B)** DATS-SOR kristallisiert in 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 / 2,0 M Natriumformiat. **(C)** DTBPS-SOR kristallisiert in 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6 / 1,0 M Ammoniumphosphat. **(D)** GO-SOR kristallisiert in 0,4 M Ammoniumphosphat. Die Größenbalken entsprechen 0,1 mm.

Die Daten der Röntgendiffraktion wurden von Carlos Frazão (ITQB, Oeiras, Portugal) gesammelt. Hierzu wurde für die DDS-SOR und die DATS-SOR die Synchrotronstrahlenquelle I04 der Diamond Light Source (DLS, Oxfordshire, England) mit einer Wellenlänge von 0,9795 Å und für die DTBPS-SOR die Strahlenquelle P14 des Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) mit einer Wellenlänge von 1,5498 Å verwendet. Für die GO-SOR fanden bislang keine Messungen statt. Die Analyse und Bearbeitung der Rohdaten sowie die Erstellung der initialen Elektronendichtekarten und Strukturmodelle wurde ebenfalls von Carlos Frazão durchgeführt. Die wichtigsten Diffraktionsdaten, kristallographischen Parameter und Statistiken zum *Refinement* der SOR-Inhibitor-Komplexe sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13:** Kristallographische Parameter, gesammelte Diffraktionsdaten und Statistiken zum *Refinement* der Kristallstrukturen der SOR-Inhibitor-Komplexe. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

Parameter	DDS-SOR	DTBPS-SOR	DATS-SOR
Quelle der Röntgenstrahlung	Diamond I04	DESY-P14	Diamond I04
Wellenlänge (Å)	0,9795	1,5498	0,9795
Raumgruppe	P6 <sub>3</sub> 22	I4	I4
Parameter Elementarzelle (Å)	a = b = 158,40 c = 227,96	a = b = 161,90 c = 153,76	a = b = 162,01 c = 153,86
Auflösung (Å)	137,24 - 1,70 (1,74 - 1,70)	65,52 - 1,98 (2,10 - 1,98)	76,93 - 2,10 (2,23 - 2,10)
Anzahl einzelner Intensitäten	183402	271818	226318
Redundanz	73,03 (53,18)	6,65 (5,83)	3,44 (3,83)
I/σ (I)	20,7 (1,31)	10,34 (1,30)	10,37 (1,35)
R <sub>meas</sub> (%)	35,3 (386,9)	17,2 (155,1)	14,3 (106,5)
R <sub>pim</sub> (%)	3,02 (13,77)	5,56 (32,39)	4,78 (24,72)
R <sub>sym</sub> (%)	35,0 (383,3)	15,9 (141,3)	12,1 (78,6)
Vollständigkeit (%)	99,9 (99,2)	99,8 (99,6)	99,3 (99,1)
Untereinheiten pro asym. Einheit	4	6	6
Wilson B (Å <sup>2</sup> )	21	30	34
<b>Struktur nach <i>Refinement</i></b>	1228 Aminosäuren 920 Wassermoleküle 4 Eisenatome	1842 Aminosäuren 775 Wassermoleküle 6 Eisenatome 2 Phosphatmoleküle	1842 Aminosäuren 814 Wassermoleküle 6 Eisenatome
R <sub>work</sub> (%)	16,45	14,93	16,03
R <sub>free</sub> (%)	18,77	18,66	20,72
Average ADP (Å <sup>2</sup> )	28	31	32
Bonds RMSD (Å)	0,011	0,016	0,019
Angles RMSD (°)	1,064	1,073	1,078

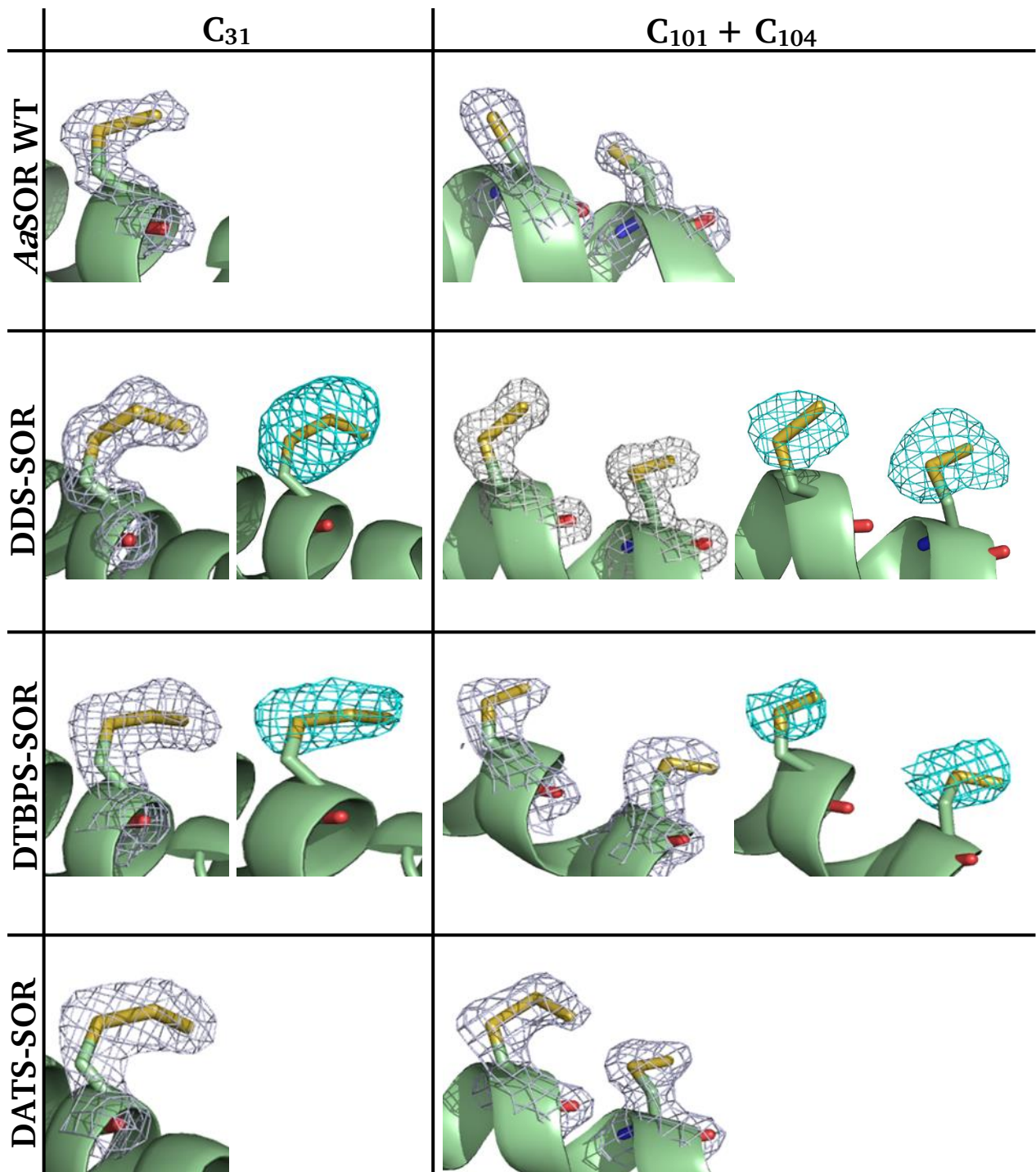
Zur Identifikation potentieller Inhibitoraddukte wurden die  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarten der jeweiligen SOR-Inhibitor-Komplexe mit WinCoot auf Bereiche mit zusätzlicher Elektronendichte überprüft, die vom ursprünglichen Modell der AaSOR nicht abgedeckt werden und auf potentielle Modifikationen hinweisen können. Bei der Analyse fiel auf, dass in allen Untereinheiten der SOR-Inhibitor-Komplexe eine zusätzliche Elektronendichte an den terminalen Schwefelatomen der Cysteine C<sub>101</sub>, C<sub>104</sub> und dem Cysteinpersulfid CSS<sub>31</sub> lokalisiert ist. Abbildung 31 zeigt diese zusätzliche Elektronendichte exemplarisch für die DDS-SOR.



**Abbildung 31:** Zusätzliche Elektronendichte am Cysteinpersulfid CSS<sub>31</sub> (A) und den beiden Cysteinen C<sub>101</sub> (B) und C<sub>104</sub> (C) bei ausgewählten Untereinheiten der DDS-SOR. Die 2  $F_o-F_c$  Elektronendichtekarten sind mit einem Konturierungslevel von 1,0  $\sigma$  als blaues Netz abgebildet. Die zusätzliche Elektronendichte ist als grünes Netz in der  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarte mit einem Konturierungslevel von 3,0  $\sigma$  dargestellt.

Die zusätzlichen Elektronendichten an den Cysteinen sind bei allen SOR-Inhibitor-Komplexen auf einen kleinen Bereich begrenzt und weisen auf eine Modifikation dieser Reste hin. Zur besseren Interpretation der vorliegenden Inhibitoraddukte wurden anomale Elektronendichtekarten aufgenommen und auf Signale einer anomalen Dispersion untersucht. Die anomale Dispersion beschreibt eine Phasenänderung bei der Diffraktion von Röntgenstrahlung. Sie tritt auf, wenn die Energie der einfallenden Röntgenstrahlung oberhalb der Absorptionskante eines entsprechenden Elements liegt. Dabei erfolgt die Diffraktion der Photonen in einer geänderten Phase und unterscheidet sich von den restlichen Atomen in der Kristallstruktur. Dieser Effekt kann bei geeigneter Wellenlänge zur spezifischen Identifikation von Metallen oder auch zur Lokalisierung von Schwefelatomen in der Kristallstruktur verwendet werden. Für die anomale Dispersion wurde Röntgenstrahlung mit 6,70 keV für die DDS-SOR und 8,00 keV für die DTBPS-SOR verwendet. Bei diesen Wellenlängen hat Schwefel ein signifikantes anomales Signal (6,70 keV: 0,73 e; 8,00 keV: 0,56 e). Die Analyse der anomalen Elektronendichtekarten zeigt ein anomales Signal am Ort der zusätzlichen Elektronendichten an den Cysteinen.





**Abbildung 32:** Stick-Darstellungen der konservierten Cysteine der AaSOR-Wt und der SOR-Inhibitor-Komplexe aus jeweils einer ausgewählten Untereinheit der Kristallstruktur. Die 2  $F_o - F_c$  Elektronendichtekarten sind mit einem Konturierungslevel von 1,0  $\sigma$  als weißes Netz abgebildet. Die anomalen Elektronendichtekarten wurden mit 6,70 keV (DDS-SOR) und 8,00 keV (DTBPS-SOR) aufgenommen und sind mit einem Konturierungslevel von 3,0  $\sigma$  als cyanfarbenes Netz dargestellt.

Die zusätzliche Elektronendichte wurde daher als weiteres Schwefelatom interpretiert. Basierend auf diesen Beobachtungen wurden die Cysteine C<sub>101</sub> und C<sub>104</sub> in den Kristallstrukturen der DDS- und DTBPS-SOR als Cysteinpersulfid und C<sub>31</sub> als Trisulfid modelliert (Abb. 32). Für die DATS-SOR fand bislang keine Messung der anomalen Dispersion statt, jedoch wurde aufgrund der

---

vergleichbaren Elektronendichtekarte ebenfalls von einem weiteren Schwefelatom am Ort der zusätzlichen Elektronendichte ausgegangen. In zwei der sechs kristallographisch unabhängigen Untereinheiten (Untereinheit A und D) weist die Elektronendichtekarte auf die Existenz eines weiteren Atoms an CSS<sub>101</sub> hin. Die beiden Cysteine wurden daher vorläufig als Trisulfid modelliert (Abb. 32).

In keinem der untersuchten SOR-Inhibitor-Komplexe wurde eine spezifische Modifikation eines einzelnen Cystein-Rests beobachtet. Auch war keine eindeutige Elektronendichte nachweisbar, die auf die organische Komponente der eingesetzten Inhibitoren hindeutet.

### 5.3. Diskussion

Inhibitoren stellen ein geeignetes Mittel dar, um wichtige Substrat- und Produktbindungsstellen in Enzymen mittels Röntgenkristallographie zu identifizieren. Bislang ist das Spektrum verfügbarer Inhibitoren für die SOR noch sehr limitiert und die bekannten Verbindungen trugen nur bedingt zum besseren Verständnis des Reaktionsmechanismus bei. Um das Repertoire an Inhibitoren zu erweitern, wurde der inhibitorische Effekt verschiedenster organischer Schwefelverbindungen auf die SOR untersucht (Abb. 23). Das durchgeführte Inhibitor-Screening ergab, dass lediglich die eingesetzten Oligosulfid-Komponenten DATS, DDS, DTS, DTBPS und Knoblauchöl einen inhibitorischen Effekt bewirkten. In diversen Kontrollreaktionen wurde gezeigt, dass die Verbindungen unter Reaktionsbedingungen tatsächlich die Enzymaktivität beeinflussen und die verringerten Aktivitäten nicht auf Kreuzreaktionen mit den SOR-Produkten oder einer Interferenz mit den Nachweisreaktionen beruhen. Die mittleren inhibitorischen Konzentrationen von DATS, DDS und DTS lagen dabei zwischen 0,16 mM und 1,28 mM für die Oxygenaseaktivität und zwischen 0,09 mM und 0,82 mM für die Reduktaseaktivität. Für DTBPS und das artifizielle Knoblauchölgemisch ergaben sich IC<sub>50</sub>-Werte von 0,004 % [v/v] bzw. 0,31 % [v/v] für die Oxygenase- und 0,001 % [v/v] bzw. 0,11 % [v/v] für die Reduktaseaktivität. Knoblauchöl und das darin enthaltene DATS stellten die effektivsten Inhibitoren dar. Das mit 30 - 50 % Anteil im Knoblauchöl enthaltene Diallyldisulfid scheint primär für den inhibitorischen Effekt des Gemisches verantwortlich zu sein.

Zum Nachweis von Inhibitoraddukten und Identifikation entsprechender Bindungsstellen im Enzym wurden SOR-Inhibitor-Komplexe für röntgenkristallographische Analysen erzeugt. Bei der Präparation dieser Komplexe stellten sich für die Inhibition entscheidende Charakteristiken heraus. Allen Inhibitoren ist gemein, dass eine hemmende Wirkung auf die Enzymaktivität lediglich in Gegenwart von elementarem Schwefel bei erhöhten Temperaturen erfolgt. Zudem findet eine vollständige Inhibition erst bei einer Verdünnung der Enzymkonzentration auf  $\leq 5 \mu\text{g/mL}$  statt. Mit DTS gelang es nicht, einen stabilen SOR-Inhibitor-Komplex zu generieren. Als Ursache kann

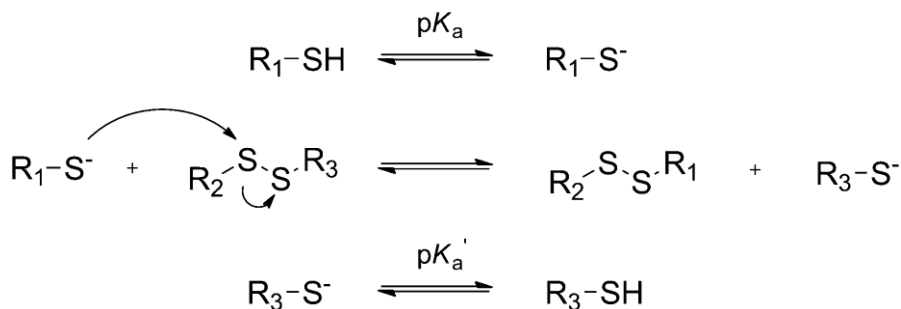
---

die geringe chemische Stabilität der Verbindung bei hohen Temperaturen angesehen werden. Bei der Inkubationstemperatur von 80 °C zerfällt DTS in Dimethyldisulfid und Dimethyltetrasulfid. Dimethyltetrasulfid wiederum ist sehr reaktiv und führt über Dissoziations- und Disproportionierungsreaktionen zu einem Gemisch aus Polysulfiden, Dimethyldisulfid bis Dimethylhexasulfid sowie Radikalen (Pickerin *et al.*, 1967). Daher wurde DTS als Inhibitor verworfen.

Die UV/VIS-Spektren der SOR-Inhibitor-Komplexe wiesen mit Ausnahme der GO-SOR keine Unterschiede zur nicht-inhibierten AaSOR auf (Abb. 29). Das Spektrum der mit Knoblauchöl inhibierten SOR umfasste eine Schulter im Wellenlängenbereich zwischen 300 und 330 nm. Eine Schulter in diesem Wellenlängenbereich ist ein charakteristischer Bestandteil der Spektren von Eisen-Schwefel-Proteinen (Curatti *et al.*, 2008). Möglicherweise resultiert diese Absorptionsänderung auf einer Interaktion der im Knoblauchöl enthaltenen Komponenten mit dem Eisenzentrum der SOR. Da das Spektrum der DATS-SOR diese Schulter nicht aufwies, scheint die Absorptionsänderung durch Diallyldisulfid oder das Allylsulfid bewirkt zu werden. Für die GO-SOR fanden bislang jedoch keine Röntgenstrukturanalysen statt, weshalb die Auswirkungen auf das aktive Zentrum der SOR rein spekulativ sind.

Die Inhibition der SOR und das Verständnis des Inhibitionsmechanismus werden durch die Tatsache erschwert, dass alle eingesetzten organischen Oligosulfidverbindungen in Wasser nur schwer löslich bis unlöslich sind. Am Beispiel von Tubulin wurde jedoch bereits demonstriert, dass DATS als potenter Inhibitor der Tubulinpolymerisierung fungieren kann. Die Inhibition erfolgt in diesem Fall bei weitaus höheren Proteinkonzentrationen (1 mg/mL) und geringerer DATS-Konzentration (100  $\mu$ M). Auch fand die Inhibition ohne externe Zugabe von elementarem Schwefel statt (Hosono *et al.*, 2005). Dies wirft die Frage auf, warum eine Inhibitionswirkung auf die SOR lediglich bei geringen Enzymkonzentrationen und in Gegenwart von elementarem Schwefel stattfand. Eine Erklärung könnte der sehr komplexe Aufbau der SOR sein. Während die Cysteine der Tubuline direkt für DATS zugänglich sind, muss DATS erst in die innere Kavität der SOR gelangen und erreicht das aktive Zentrum nur durch das Passieren einer weiteren Zugangspore. In Verbindung mit der sehr geringen Anzahl gelöster Inhibitormoleküle könnte dies eine Inhibition der SOR um ein Vielfaches erschweren. Die Applikation von elementarem Schwefel ermöglicht jedoch eine Inhibition der SOR durch DATS und die übrigen Oligosulfidverbindungen. In Kombination mit der Erhöhung der Temperatur scheint eine Aktivierung der Oligosulfidverbindungen zu erfolgen, die den Zugang zum aktiven Zentrum ermöglicht. Als grundlegender Mechanismus für diese Aktivierung und die spätere Inhibition ist eine Thiol-Disulfid- bzw. eine Thiol-Polysulfid-Austauschreaktion denkbar (Abb. 33).





**Abbildung 33:** Die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion. In Abhängigkeit des pH-Wertes entsteht ein Thiolatanion als reaktives Nukleophil. Es erfolgt ein nukleophiler Rückseitenangriff des Thiolatanions auf die Disulfidbindung, wobei ein Schwefelatom und der zugehörige Rest in dieser Verbindung durch das Nukleophil substituiert werden. Das neu entstandene Thiolatanion steht wiederum in Abhängigkeit des pH-Wertes im Gleichgewicht mit der Thiolform (Black *et al.*, 2014).

Beim Thiol-Disulfid-Austausch kommt es bei der Reaktion eines Thiols ( $\text{R}_1\text{SH}$ ) mit einem Disulfid ( $\text{R}_2\text{S-SR}_3$ ) zur Bildung eines neuen Disulfids ( $\text{R}_1\text{S-SR}_3$ ) und eines neuen Thiols ( $\text{R}_2\text{SH}$ ), das vom ursprünglichen Disulfid abgeleitet ist. Dabei handelt es sich um eine  $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion mit einem Thiolatanion ( $\text{R}_1\text{S}^-$ ) als aktives Nukleophil. Die Reaktion findet bereits bei Raumtemperatur und physiologischem pH-Wert statt (Szajewski *et al.*, 1980). Die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion kann analog auch durch nukleophilen Angriff auf eine Polysulfidverbindung (z.B. DATS) als sogenannte Thiol-Polysulfid-Austauschreaktion ablaufen (Münchberg *et al.*, 2007). Das Reaktionsprinzip ist somit für alle eingesetzten Inhibitoren anwendbar, wobei vermutlich die Polysulfid-Form des elementaren Schwefels das aktive Nukleophil darstellt. Die oben beschriebene Aktivierung des Inhibitors würde folglich durch Übertragung der Abgangsgruppe auf die Polysulfidkette erfolgen. Das Produkt dieser Reaktion könnte wiederum in einer Thiol-Polysulfid-Austauschreaktion die Thiolgruppen von Cysteinen im aktiven Zentrum der SOR modifizieren und so inaktivieren. Solche Modifikationen sind bereits bei einigen Disulfiden und Polysulfiden bekannt, welche Thiolgruppen in einem Protein zu gemischten Disulfiden modifizieren können (Münchberg *et al.*, 2007). Der Inhibitionsmechanismus wäre im Fall der SOR demnach ein zweistufiger Prozess, der im ersten Schritt eine Aktivierung des Inhibitors und im zweiten Schritt eine Inaktivierung der Cysteine umfasst. Das Resultat wäre ein Gemisch verschiedener Modifikationen an den Cysteinen. Das Ergebnis der röntgenkristallographischen Analysen bekräftigt diese These. Bei allen untersuchten SOR-Inhibitor-komplexen wurde die Existenz eines zusätzlichen Schwefelatoms an den beiden Cysteinen  $\text{C}_{101}$  und  $\text{C}_{104}$  sowie am Cysteinpersulfid  $\text{CSS}_{31}$  festgestellt. Dies steht im Einklang mit den massenspektroskopischen Analysen der mit DATS inhibierten Tubulinen. Auch dort wurde eine Oxidation der Thiolgruppen von Cysteinen zu Disulfiden (Cys-S-S-Allyl) nachgewiesen (Hosono *et al.*, 2005).

Die Elektronendichtekarten gaben neben der Existenz eines zusätzlichen Schwefelatoms keinen Hinweis auf die zugehörige organische Inhibitor-komponente (Abb. 31 & 32). Dies lässt sich durch

---

die Tatsache erklären, dass eine Kristallstruktur eine Abbildung aller im Kristall befindlicher Moleküle darstellt. Die Modifikation von Cysteinen durch Di- und Polysulfide kann zu einem Produktgemisch unterschiedlicher Länge führen (Mishanina *et al.*, 2015). Liegen unterschiedliche Modifikationen an einem Cystein vor, so sind diese in der Kristallstruktur nicht erkennbar und die tatsächlichen Inhibitoraddukte sind nicht nachzuweisen. Die initiale Reaktion der Inhibitoren mit Schwefel bzw. Polysulfid führt zusätzlich zu einer weiteren Randomisierung der möglichen Addukte. Zudem kann mit zunehmender Kettenlänge und Flexibilität einer Verbindung die sichtbare Elektronendichte in einer Kristallstruktur sinken, da die Elektronen nicht lokal begrenzt, sondern über den gesamten Flexibilitätsbereich verteilt vorliegen können. Dies erklärt, weshalb lediglich das zusätzliche Schwefelatom als gemeinsames Charakteristikum der Modifikationen nachgewiesen werden kann. Eine detaillierte Charakterisierung der vorliegenden Inhibitoraddukte könnte in weiteren Experimenten eine massenspektroskopische Analyse der SOR-Inhibitor-Komplexe liefern.

Eine Identifikation der Substrat- oder Produktbindungsstellen in der SOR konnte mit den verwendeten Oligosulfidverbindungen nicht erreicht werden. Die Oligosulfide bewirkten zwar eine Reduktion der Enzymaktivität, es fand jedoch keine spezifische Modifikation eines einzelnen Cysteins im Enzym statt. Zudem erschwert die starke Randomisierung der Inhibitoraddukte deren genaue Analyse.

---

## 6. Charakterisierung von SOR-Derivaten mit Heterometallen

---

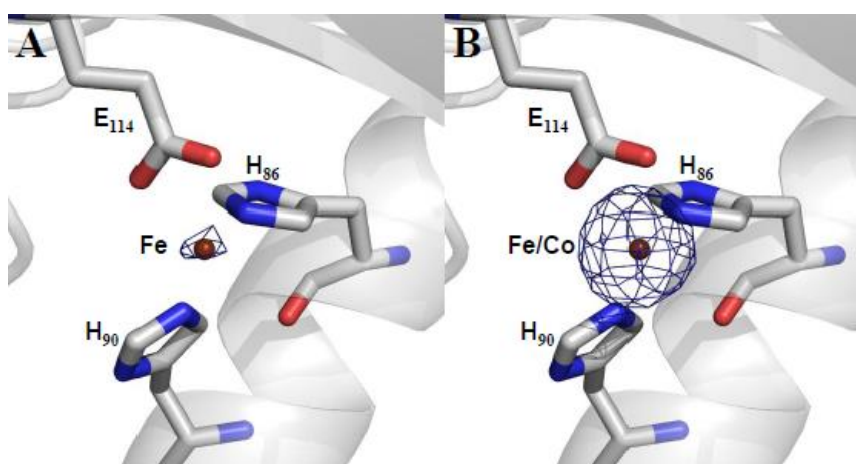
### 6.1. Einleitung

Durch Elektronenspinresonanz-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass das Eisen-Atom im aktiven Zentrum der AaSOR als  $\text{Fe}^{3+}$  vorliegt und nach Inkubation des Enzyms mit Schwefel bei hohen Temperaturen zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird (Urich *et al.*, 2004). Unklar ist jedoch, ob der beobachtete Wechsel des Redoxzustands essentiell für die Aktivität der SOR ist und ob die Sauerstoffaktivierung bei der Katalyse durch das Metallzentrum oder das Substrat vermittelt wird. Um diese Fragen zu klären, wurden bereits in einer vorangegangenen Dissertation SOR-Derivate mit verschiedenen Metallsubstitutionen erzeugt und hinsichtlich ihrer Aktivität, der Zusammensetzung der Metallzentren und der Redoxzustände der Metalle untersucht (Veith, 2011a). Der Metallaustausch erfolgte durch Entfaltung und anschließender Rückfaltung von AaSOR *inclusion bodies* in Gegenwart des entsprechenden Metalls. Als Heterometalle kamen Cobalt, Mangan, Nickel, Gallium, Ruthenium, Kupfer Vanadium und Magnesium zum Einsatz. Eine Aktivität wurde mit Co (Co-SOR), Ga (Ga-SOR), Ni (Ni-SOR) und Mn (Mn-SOR) nachgewiesen. Bei keinem der getesteten SOR-Derivate wurde ein Wechsel des Redoxzustands beobachtet. Die Hyperfeinaufspaltung der ESR-Signale für Cobalt verschwand nach Inkubation mit Schwefel bei hoher Temperatur und die Signalintensität der ESR-Spektren von Cobalt und Mangan nahmen leicht ab, was auf leichte strukturelle Änderungen des Metallzentrums während der Katalyse hindeutet. Die 3D-Struktur der Co-SOR wies hingegen keine signifikanten strukturellen Änderungen im aktiven Zentrum und der primären und sekundären Koordinationssphäre auf. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass ein Wechsel des Redoxzustands während der Katalyse nicht essentiell ist. Die Fragestellung konnte letztendlich jedoch nicht eindeutig beantwortet werden, unter anderem weil die Interpretation der Daten durch geringe Restmengen Eisen in den Präparationen der SOR-Derivate erschwert wurde. Eisen wurde sowohl in den ESR-Spektren als auch in der Kristallstruktur der Co-SOR nachgewiesen, auch wenn das aktive Zentrum zu einem deutlich höheren Teil von Cobalt besetzt war (Abb. 34). Metallanalysen und Kristallstrukturen der SOR-Derivate mit Ga, Mn und Ni lagen nicht vor.

Zur Vermeidung von Eisenkontaminationen wurde die Rückfaltung der AaSOR in dieser Arbeit mit hochreinen Metallen wiederholt. Aktivitätsbestimmungen sollten klären, ob die zuvor beobachteten Aktivitäten der SOR-Derivate mit Co, Ga, Mn und Ni auf Restmengen Fe in den Präparationen zurückzuführen sind. Die rückgefalteten SOR-Präparate wurden durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry*: ICP-MS) analysiert und auf die Anwesenheit der entsprechenden Metalle geprüft. Die Untersuchung der Oxidationszustände der jeweiligen Metalle vor und nach Katalyse erfolgte

durch ESR-Spektroskopie. Die verschiedenen SOR-Derivate wurden kristallisiert, um strukturelle Änderungen im aktiven Zentrum untersuchen zu können. Die Analyse der Metallzusammensetzung der kristallisierten Enzyme erfolgte durch Röntgenfluoreszenzspektroskopie und der Nachweis sowie die Lokalisierung der entsprechenden Metalle im aktiven Zentrum anhand ihrer anomalen Signale.

Der Nachweis einer aktiven SOR mit redox-inaktivem  $\text{Ga}^{3+}$  im aktiven Zentrum ohne Eisenkontamination würde bedeuten, dass ein Redoxwechsel nicht essentiell für die Katalyse der SOR ist. Aktive SOR-Präparationen mit  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ , die ihren Oxidationszustand während der SOR-Reaktionen nicht ändern, würden dies bestätigen.

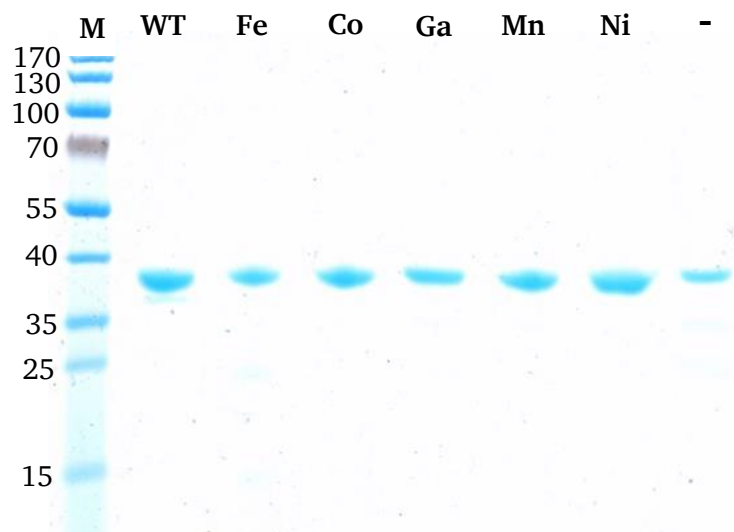


**Abbildung 34:** Metallzentrum der kristallisierten Co-SOR mit zugehörigen Liganden. (A) Anomale Differenzelektronendichtekarte der anomalen Diffraktion von Eisen (blaues Netz) mit Eisenatom (orangene Kugel). (B) Anomale Differenzelektronendichtekarte der anomalen Diffraktion von Eisen und Cobalt (blaues Netz) mit einer Mischung aus Eisen- und Cobaltatom (orangene Kugel) (Veith, 2011a).

## 6.2. Ergebnisse

Die Präparation von SOR-Derivaten mit Austauschmetallen im aktiven Zentrum erfolgte durch Rückfaltung denaturierter *AaSOR inclusion bodies* in Gegenwart der entsprechenden Metalle. Zur Entfaltung der isolierten *inclusion bodies* wurden diese in Denaturierungspuffer mit 8 M Harnstoff und  $\beta$ -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel resuspendiert und für 1 h bei 60 °C erhitzt. Die durch Erhitzung präzipitierten, hitzelabilen *E. coli*-Proteine wurden durch Zentrifugation separiert. Die Rückfaltung der SOR erfolgte durch serielle Dialysen mit abnehmender Harnstoff-Konzentration in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  der entsprechenden Metalle (Fe, Co, Ga, Mn, Ni). Eine metallfreie SOR wurde durch Rückfaltung ohne Zugabe von Metallen erhalten. Zur Vermeidung von Metallkontaminationen erfolgten die Rückfaltungen unter hochreinen Bedingungen mit Metallen hoher Reinheit (Mindestreinheit 5N). Als Metallsalze wurden Cobalt(II)-nitrat (5N), Mangan(II)-acetat (5N) und Nickel(II)-nitrat (5N5) verwendet. Ga(III)-chlorid wurde durch das Auflösen von

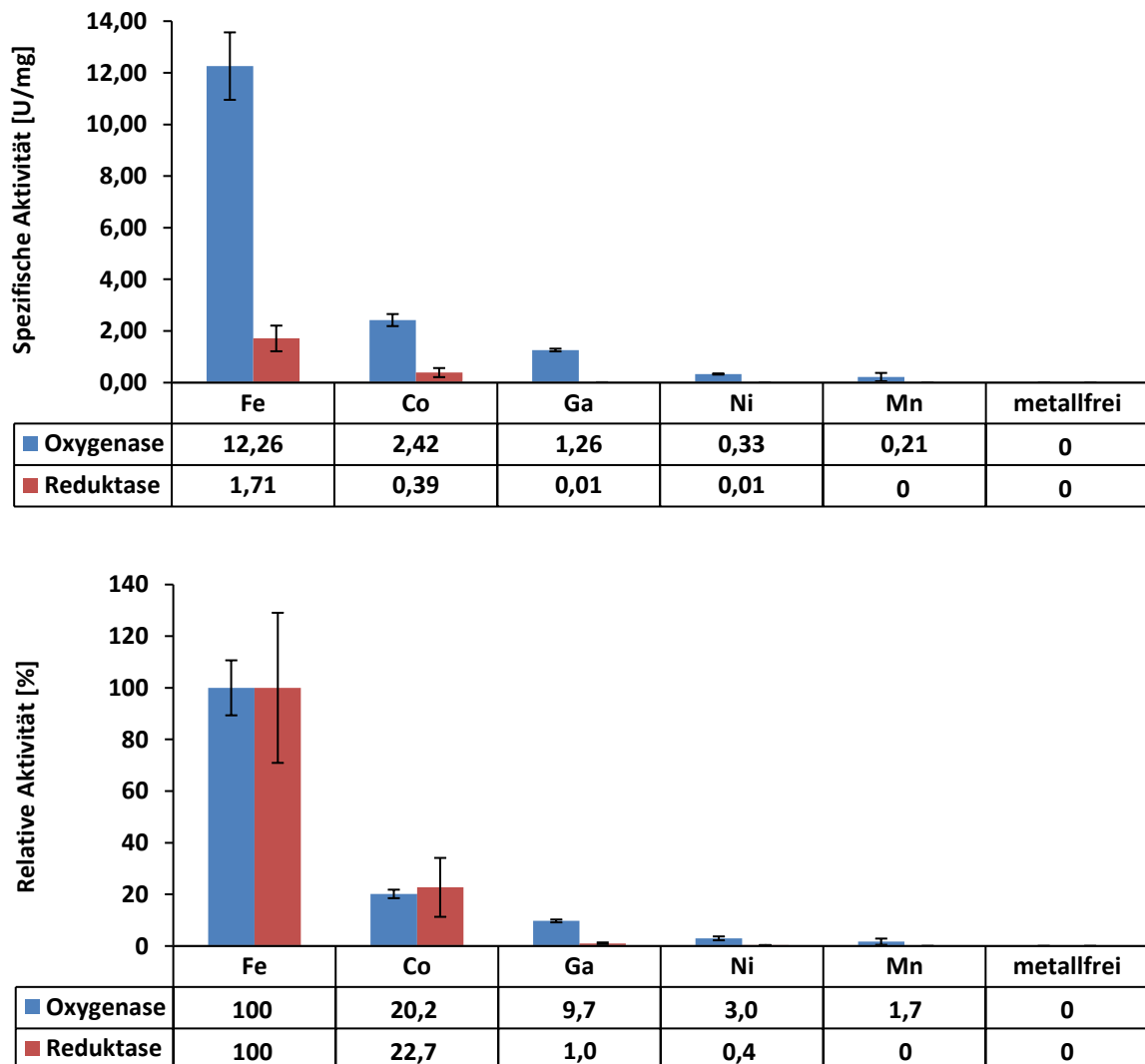
elementarem Gallium (7N) in konzentrierter Salzsäure mit hoher Reinheit (ROTIPURAN/Art.-Nr. 4625.2) gewonnen. Analog zur heterologen Genexpression wurde für die Fe-SOR den Dialysepuffern 100  $\mu$ M Eisen(II)citrat-Lösung zugegeben. Alle Glaswaren und Materialien wurden vor Gebrauch mit konzentrierter Salzsäure gewaschen. Dialyseschläuche wurden zur Entfernung von Spurenelementkontaminationen in 2 % Natriumbicarbonat und 1 mM EDTA gekocht. Alle verwendeten Dialysepuffer wurden vor ihrer Verwendung mit Chelex 100 behandelt. Hierbei handelt es sich um einen Anionenaustauscher mit hoher Metallaffinität, der in vielen Anwendungsbereichen zur Entfernung von Metallen aus Proben, Medien und Lösungen zum Einsatz kommt (Dunn *et al.*, 1980; Knapp *et al.*, 1987; Pai *et al.*, 1990). Zur Entfernung fehlgefalteter Proteine wurden die rückgefalteten SOR-Derivate via *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie gereinigt. Für die Denaturierung und Rückfaltung wurden 95 - 756 mg solubilisierter *inclusion bodies* eingesetzt. Die Rückgewinnung variierte zwischen 0,5 und 3,8 % mit Proteinausbeuten zwischen 2,5 und 8,0 mg je Rückfaltung. Die Reinheit der präparierten SOR-Derivate wurde durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 35). Als Referenz diente rekombinante AaSOR-Wt.



**Abbildung 35:** Coomassie-gefärbtes 10 % SDS-Gel der gereinigten SOR-Metallderivate. **M**, Marker – Korrespondierende Bandengröße in kDa. **WT**, rekombinante AaSOR-Wt. Aus *inclusion bodies* rückgefaltete SOR-Derivate mit Metallsubstitutionen: **Fe**, Eisen; **Co**, Cobalt; **Ga**, Gallium; **Mn**, Mangan; **Ni**, Nickel. Die letzte Spur zeigt eine metallfreie rückgefaltete SOR-Präparation. 5  $\mu$ g Protein pro Spur, Marker *prestained* # SM0671.

Für alle SOR-Derivate wurde eine Bande im Bereich zwischen 35 und 40 kDa beobachtet, die damit der Masse der rekombinanten AaSOR-Wt entspricht. Die Spuren mit rückgefalteter Fe-SOR und metallfreier SOR ließen zudem kleinere proteolytische Abbaubanden im Bereich von 25 - 30 kDa erkennen (Urich *et al.*, 2004).

Für die Aktivitätsbestimmung der metallsubstituierten SORs wurden die Aktivitäten aus drei unabhängigen Enzympräparationen ermittelt. Für die Ga-SOR konnten aufgrund der geringen Rückfaltungseffizienz lediglich Messungen von 2 Präparationen durchgeführt werden. Die Messung der Aktivitäten erfolgte unter Einsatz von 10 -100  $\mu\text{g}$  gereinigtem Protein. Die Aktivität der in Gegenwart von Eisen rückgefalteten SOR wurde als Referenz auf 100 % gesetzt und mit den Aktivitäten der anderen SOR-Derivate verglichen (Abb. 36).

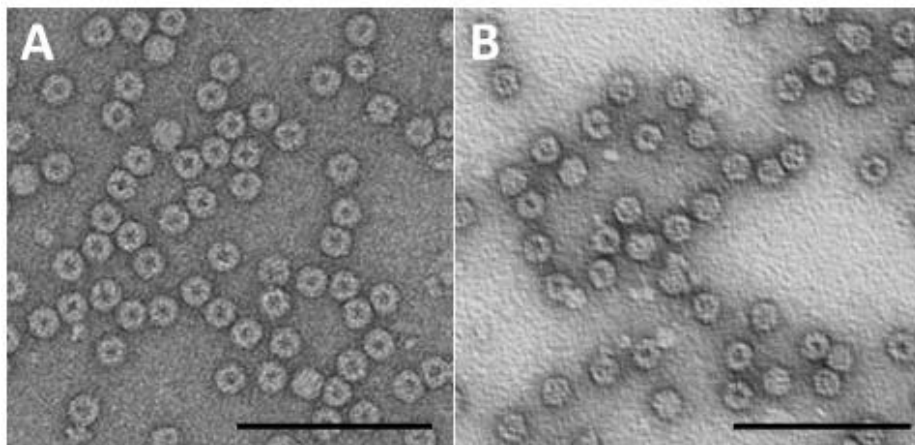


**Abbildung 36:** Spezifische und relative Aktivitäten der rückgefalteten SOR-Metallderivate. (■) Oxygenaseaktivität (Thiosulfat + Sulfid), (■) Reduktaseaktivität ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Die spezifischen Aktivitäten sind Mittelwerte aus mindestens drei Aktivitätsbestimmungen, die von drei unabhängigen Enzympräparationen durchgeführt wurden (außer Ga-SOR: 2 unabhängigen Präparationen).

Die spezifischen Aktivitäten aller rückgefalteten metallsubstituierten SOR-Präparationen lagen deutlich unter der durchschnittlichen spezifischen Aktivität der rekombinanten AaSOR-Wt (ca. 40 U/mg). Mit 12,3 U/mg Oxygenaseaktivität und 1,7 U/mg Reduktaseaktivität wies die Fe-SOR die höchsten Aktivitäten aller rückgefalteten SOR-Präparationen auf. Für die Heterometall-SORs

wurden wesentlich geringere Aktivitäten ermittelt. Mit 20,2 % (2,4 U/mg) Oxygenase- und 22,7 % (0,4 U/mg) Reduktaseaktivität war die Co-SOR die aktivste rückgefaltete SOR mit Heterometall. Die relativen Oxygenase- und Reduktaseaktivitäten der Ga-SOR betrugen 9,7 % (1,3 U/mg) und 1 % (0,01 U/mg) verglichen mit der Fe-SOR. Sehr geringe Aktivitäten wurden für die Mn-SOR und Ni-SOR ermittelt. Die relativen Aktivitäten der Ni-SOR betrugen für die Oxygenase 3,0 % (0,3 U/mg) und für die Reduktase 0,4 % (0,01 U/mg). Die geringsten Aktivitäten wurden für die Mn-SOR beobachtet. Mit 0,2 U/mg betrug die spezifische Oxygenaseaktivität lediglich 1,7 % der für die Fe-SOR nachgewiesenen Oxygenaseaktivität. Eine Detektion der Reduktaseaktivität war nicht möglich.

Zur besseren Interpretation der ermittelten Aktivitäten und Überprüfung von Faltung und Morphologie der Heterometall-SORs, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Abbildung 37 zeigt eine Negativfärbung mit Uranylacetat des nativen AaSOR-Wt Holoenzym (Kletzin, 1989) sowie die der exemplarisch ausgewählten rückgefalteten Co-SOR. Beide Aufnahmen zeigen globuläre Partikel mit einem intensiv gefärbten inneren Bereich. Morphologisch sind zwischen nativer und rückgefalteter AaSOR keine Unterschiede zu erkennen.

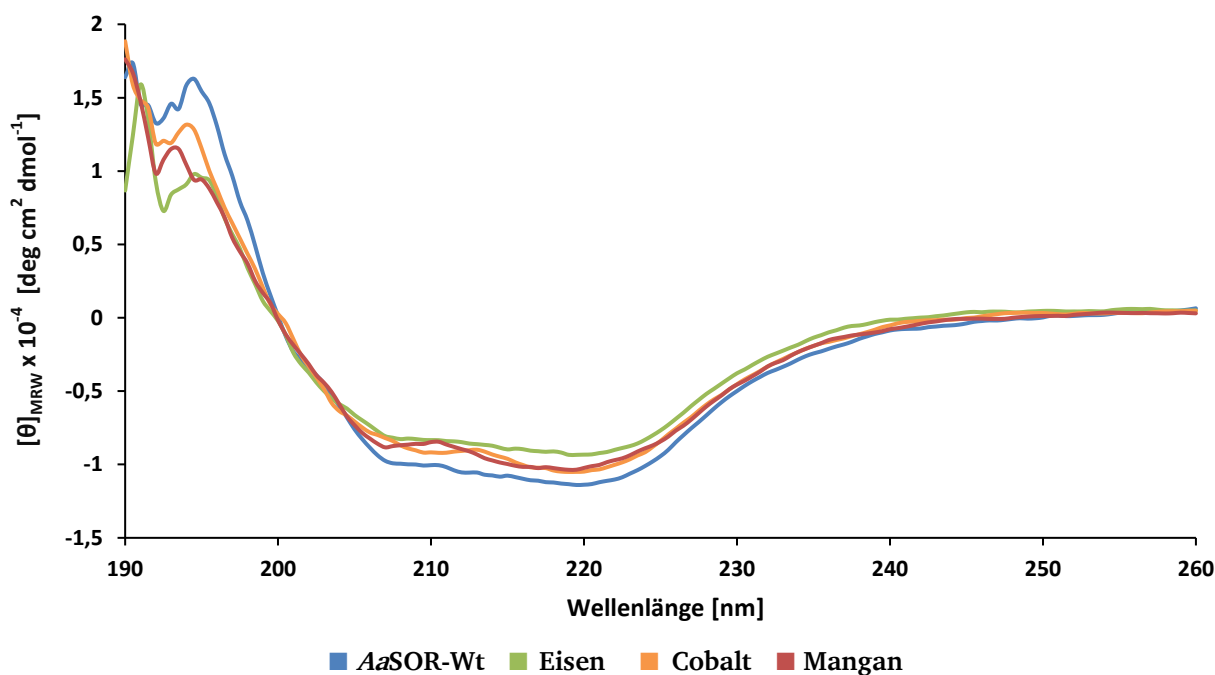


**Abbildung 37:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von AaSOR-Präparationen mit Uranylacetat-Negativkontrastierung. (A) Natives AaSOR-Wt Holoenzym (Kletzin, 1989). (B) Rückgefaltete rekombinante AaSOR mit Cobalt als Austauschmetall (A. Klingl, Biozentrum LMU München). Der Größenbalken entspricht 100 nm.

Neben den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die Qualität der Rückfaltung zusätzlich mittels CD-Spektroskopie untersucht. Hierbei wurden CD-Spektren der rekombinanten AaSOR-Wt als Referenz sowie der in Gegenwart von Cobalt, Eisen und Mangan rückgefalteten Enzyme aufgenommen (Abb. 38). Die Messungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 100  $\mu\text{g/mL}$  in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 bei 20 °C durchgeführt. Zur Dekonvolution der Daten und Quantifizierung der Sekundärstrukturelemente in den jeweiligen Präparationen wurde die CDNN-Software (Böhm *et al.*, 1992) verwendet. Die Spektren aller untersuchten AaSOR-Spezies verlaufen sehr ähnlich. Eine leichte Varianz im Verlauf ist lediglich im Bereich von 190 bis 195 nm und bei



rund 210 nm vorzufinden. Die Spektren der rekombinanten AaSOR-Wt und der mit Eisen rückgefalteten AaSOR verlaufen fast identisch und unterscheiden sich lediglich in der  $[\theta]_{\text{MRW}}$ -Signalstärke. Die Minima aller Spektren liegen im Wellenlängenbereich von 207 und 222 nm und die Maxima im Bereich von 195 nm. Lediglich bei der Mn-SOR ist das Maximum leicht verschoben und bei rund 193 nm lokalisiert.



**Abbildung 38:** CD-Spektren der rekombinanten AaSOR-Wt und rückgefalteter AaSOR-Präparationen mit Eisen, Cobalt und Mangan als Metallaustausch. Die Y-Achse gibt die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest an.

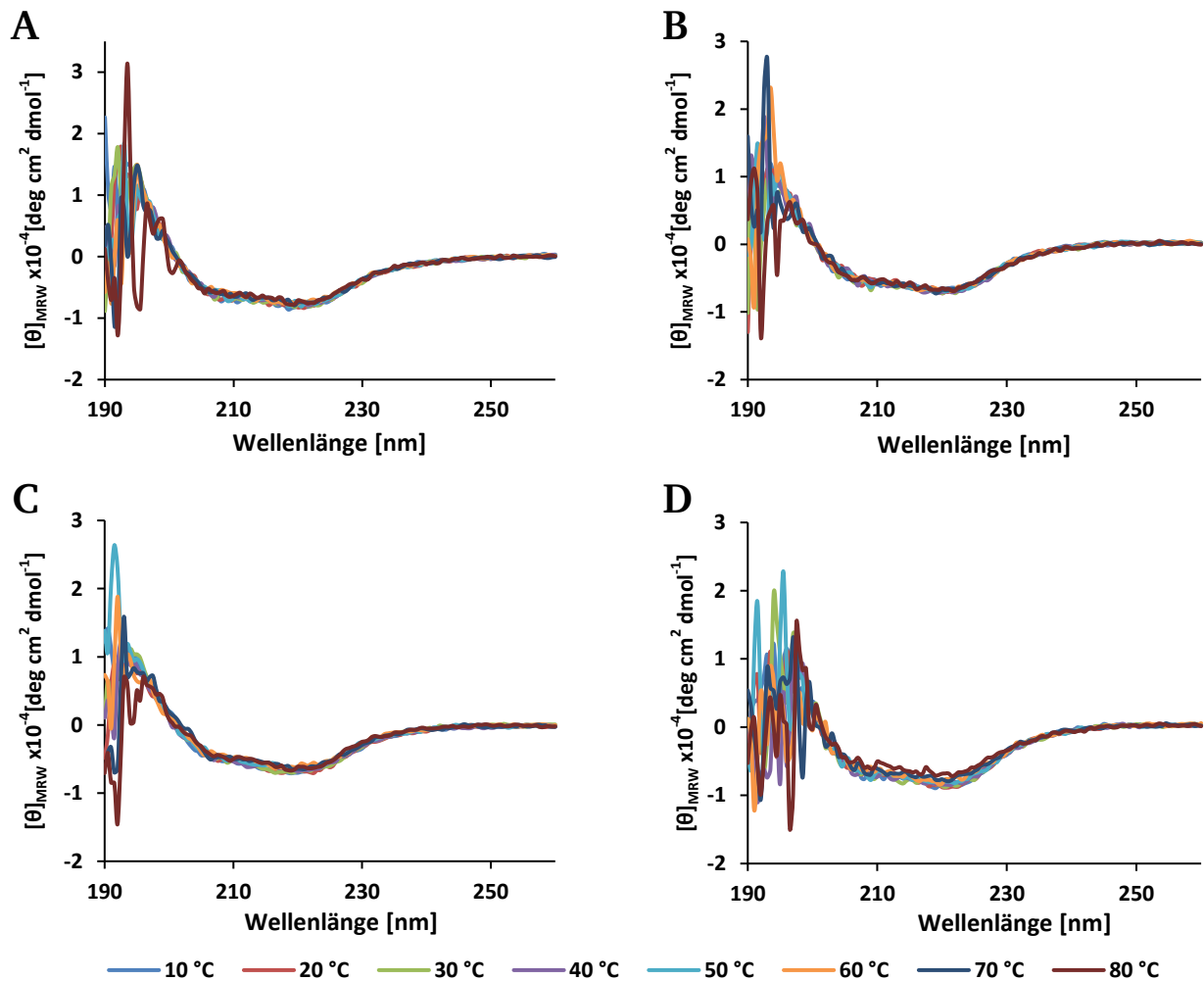
Die Quantifizierung der Sekundärstrukturelemente (Tab. 14) der rekombinanten AaSOR-Wt ergab eine Zusammensetzung aus 22,8 %  $\alpha$ -Helices, 23,1 %  $\beta$ -Faltblätter, 17,1 %  $\beta$ -Turns und 37,8 % *Random Coils*. Die analog durch Rückfaltung gewonnene Fe-SOR wies eine Zusammensetzung aus 21,4 %  $\alpha$ -Helices, 24,9 %  $\beta$ -Faltblätter, 17,8 %  $\beta$ -Turns und 35,8 % *Random Coils* auf. In einem ähnlichen Größenbereich lag auch die Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente der rückgefalteten AaSOR-Präparationen mit Cobalt und Mangan als Substitutionsmetall. Bezüglich der Morphologie und der Zusammensetzung an Sekundärstrukturelementen konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen der rekombinanten AaSOR-Wt und den durch Rückfaltung gewonnenen SOR-Derivaten mit Metallsubstitutionen festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob die rückgefalteten SOR-Spezies eine verringerte Stabilität gegenüber der rekombinanten AaSOR-Wt aufweisen, wurden von den SOR-Präparationen CD-Spektren bei steigenden Temperaturen im Bereich von 10 - 80 °C aufgenommen (Abb. 39).

**Tabelle 14:** Vorhersage der Zusammensetzung an Sekundärstrukturelementen in der rekombinanten AaSOR-Wt und den mit unterschiedlichen Metallen rückgefalteten AaSOR-Präparationen. Die Analyse und Quantifizierung erfolgten mittels CDNN-Software.

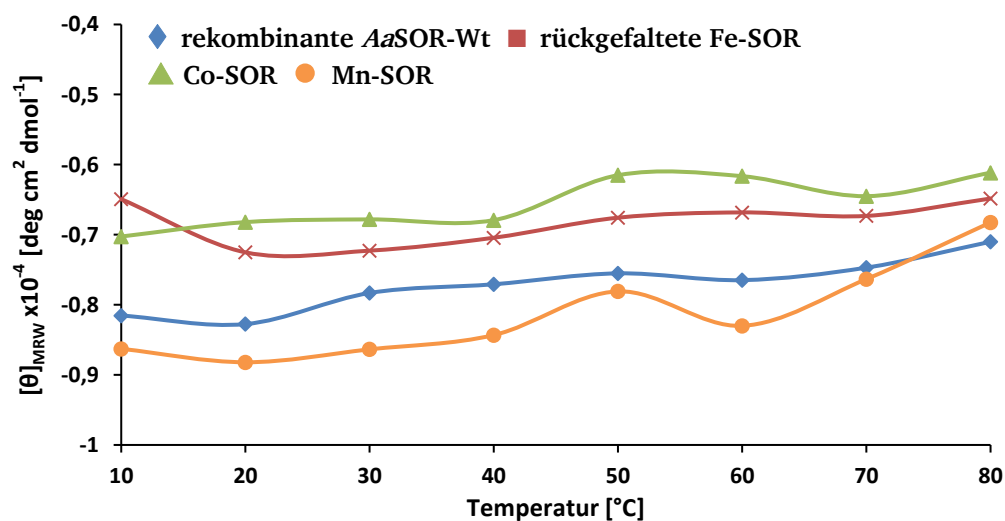
CDNN Dekonvolution	AaSOR-Wt	Fe-SOR Rückfaltung	Co-SOR Rückfaltung	Mn-SOR Rückfaltung
$\alpha$ -Helix	22,8 %	21,4 %	24,1 %	23,4 %
$\beta$ -Faltblatt	23,1 %	24,9 %	20,8 %	21,3 %
$\beta$ -Turn	17,1 %	17,8 %	16,7 %	16,8 %
Random Coil	37,8 %	35,8 %	37,4 %	37,9 %

Die Spektren wurden auf Abweichungen untersucht, die auf eine temperaturbedingte Denaturierung hindeuten könnten. Allen Spektren ist gemein, dass bei Temperaturen über 40 °C im Wellenlängenbereich von 190 - 195 nm ein starkes Rauschen auftritt. Ab 40 °C wurden auch bei den CD-Spektren der verwendeten Referenzlösung diese Schwankungen beobachtet. Im Bereich von 190 - 195 nm weist das Spektrum der Mn-SOR die stärksten Schwankungen auf, die sich bis zu einer Wellenlänge von 198 nm erstrecken. Über 199 nm verliefen die Spektren bei allen Temperaturen jedoch annähernd gleich. Für AaSOR-Wt, Fe-SOR und Co-SOR wurde bereits ab einer Wellenlänge von 196 nm keine signifikante Veränderung im CD-Spektrum bei steigenden Temperaturen beobachtet. Wie bei der zuvor durchgeführten CD-Spektroskopie ist auch im Temperaturprofil kein wesentlicher Unterschied zwischen den Spektren der rückgefalteten SOR-Derivate und der AaSOR-Wt zu erkennen.

Zum besseren Vergleich wurden die Daten in einer temperaturabhängigen Denaturierungskurve aufgetragen, welche die Änderung der mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest über den Temperaturbereich von 10 - 80 °C bei einer Wellenlänge von 220 nm anzeigt (Abb. 40). Alle Denaturierungskurven zeigen einen mit dem rekombinanten AaSOR-Wt vergleichbaren Verlauf. Nur die Mn-SOR zeigt im Bereich von 70 - 80 °C einen geringfügig steileren Anstieg der Messerwerte. Ein für die Denaturierung der SOR charakteristischer, steiler Anstieg der Kurve (Veith, 2012) trat für keines der Präparate bis zu einer Temperatur von 80 °C auf.



**Abbildung 39:** Temperaturabhängige CD-Spektren der rekombinanten AaSOR-Wt (A) und rückgefalteter AaSOR-Präparationen mit Eisen (B), Cobalt (C) und Mangan (D) als Metallaustausch. Die Y-Achse gibt die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest an

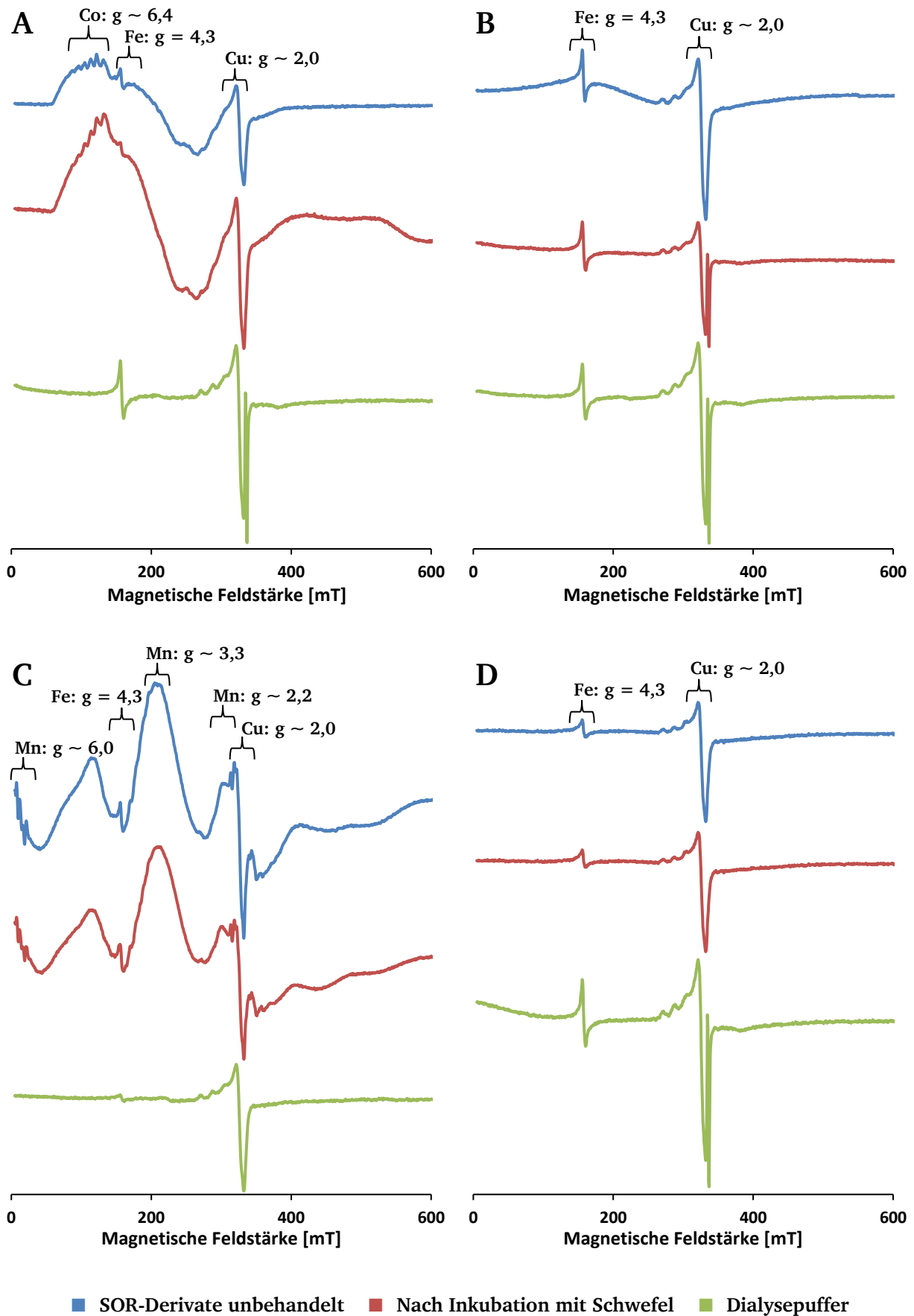


**Abbildung 40:** Temperaturabhängige Denaturierungskurven der rekombinanten AaSOR-Wt und rückgefalteter AaSOR-Präparationen mit Eisen, Cobalt und Mangan. Die ermittelte mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest aus der CD-Spektroskopie bei 220 nm wurde gegen die entsprechende Temperatur aufgetragen.

---

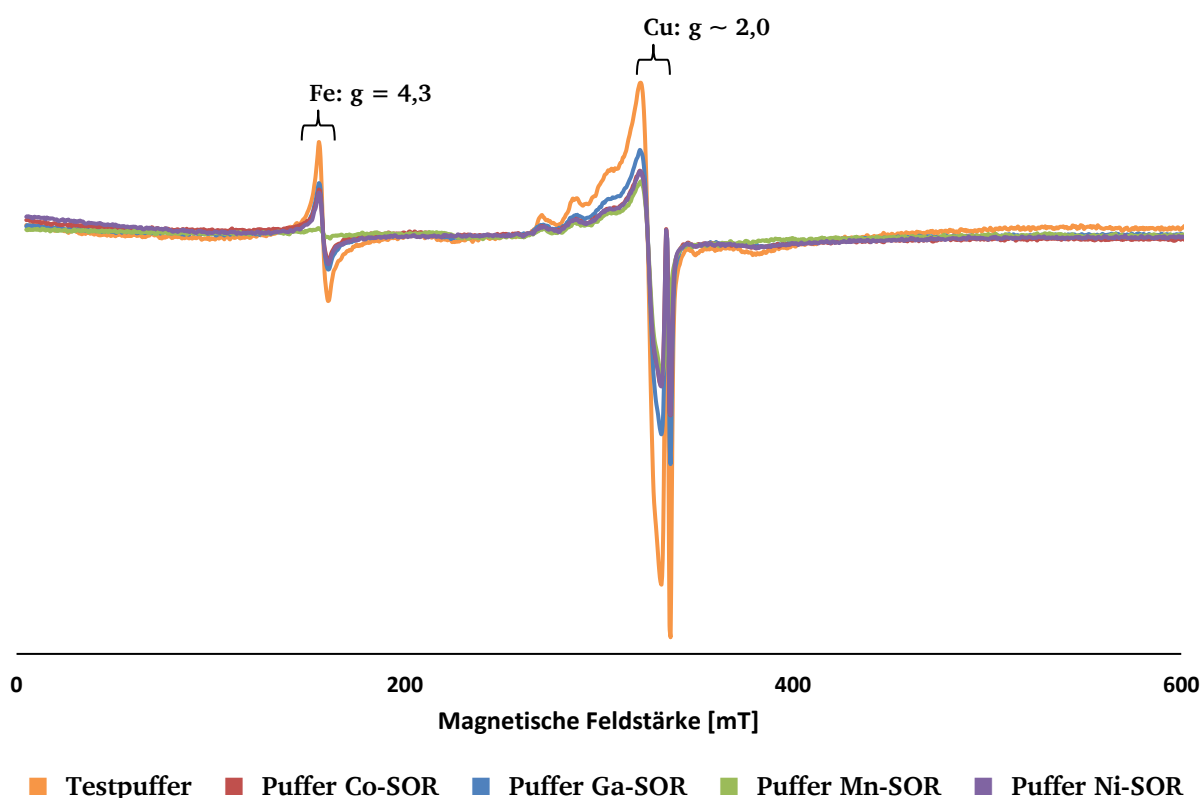
Der Redoxzustand der Austauschmetalle wurde mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) überprüft. Hierzu wurden ESR-Spektren der SOR-Derivaten vor und nach einer Inkubation mit Schwefel bei 80 °C aufgenommen, um die Metallzentren auf einen durch die Katalyse bedingten Wechsel des Oxidationszustandes zu untersuchen. Dies wurde bereits für das Eisenzentrum der AaSOR-Wt nachgewiesen. Nach der Inkubation des Enzyms zusammen mit Schwefel bei hohen Temperaturen verschwand das für mononukleare nicht-Häm Eisen-Zentren im *high-spin* Status typische isotrope  $g = 4,3$  Signal, was eine Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  indiziert. Auch die Zugabe von Dithionit bewirkte eine Reduktion des Eisens (Urich *et al.*, 2004; Veith, 2011a).

Die SOR-Derivate mit den jeweiligen Austauschmetallen wurden gegen 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 dialysiert und auf Konzentrationen zwischen 270 und 344  $\mu\text{M}$  (9,8 - 12,4 mg/mL) eingestellt. Vor der Verwendung wurden die Proteinlösungen in flüssigem Stickstoff gefroren. Die spektroskopischen Messungen wurden von Miguel Teixeira (ITQB, Oeiras, Portugal) durchgeführt. Abbildung 41 zeigt die ESR-Spektren der unterschiedlichen SORs mit Metallsubstitutionen. Das ESR-Spektrum der Co-SOR ( $c = 344 \mu\text{M}$ ) zeigt ein für *high spin*  $\text{Co}^{2+}$ -Spezies typisches Signal bei  $g \sim 6,4$  mit Hyperfeinaufspaltung (Kernspin  $I = 7/2$ ). Auch nach der Inkubation der Co-SOR mit Schwefel bei hoher Temperatur blieb die Hyperfeinaufspaltung erhalten. In einer vorangegangenen Arbeit verschwand das Interaktionsmuster nach der SOR-Reaktion (Veith, 2011a). Daneben wurden sowohl im Spektrum der Co-SOR als auch im Spektrum des verwendeten Dialysepuffers geringe Signale bei  $g = 4,3$  und  $g \sim 2,0$  detektiert, was auf Kontaminationen mit  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  hindeutet. Nach der Inkubation mit Schwefel wurde für  $\text{Co}^{2+}$  eine höhere Signalintensität detektiert, wobei sich die Stärke des  $\text{Cu}^{2+}$ -Signals verringerte. Das Spektrum der Ga-SOR (270  $\mu\text{M}$ ) blieb bis auf die bereits bei der Co-SOR beobachteten Eisen- und Kupfer-Peaks signalfrei. Auch nach der Inkubation mit Schwefel konnten keine wesentlichen Veränderungen beobachtet werden. Die Spektren der Mn-SOR (290  $\mu\text{M}$ ) zeigten die für  $\text{Mn}^{2+}$  typischen Signale bei  $g \sim 2,2$  (nahe des  $\text{Cu}^{2+}$ -Signals), den breiten Peak bei  $g \sim 3,3$  (nahe des  $\text{Fe}^{3+}$ -Signals) und einen kleinen Peak bei  $g \sim 6$ . Die Signale traten vor und nach der Inkubation mit Schwefel bei hohen Temperaturen auf. Wie auch in den vorangegangenen Experimenten verringerte sich die Intensität der  $\text{Mn}^{2+}$ -Signale nach der SOR-Reaktion nur geringfügig (Veith, 2011a). Daneben wiesen die Spektren zusätzlich Signale bei  $g = 4,3$  und  $g \sim 2,0$  auf. Die Spektren der Ni-SOR (313  $\mu\text{M}$ ) blieben bis auf die bereits zuvor beobachteten  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Signale vor und nach der SOR-Reaktion signalfrei. Alle aufgenommenen Spektren der SOR-Derivate und der zugehörigen Dialysepuffer zeigten auf  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  hindeutenden Signale bei  $g = 4,3$  und bei  $g \sim 2,0$ . Die Zugabe von Dithionit bewirkte keine Reduktion des  $\text{Fe}^{3+}$  zum signalfreien  $\text{Fe}^{2+}$  (nicht dargestellt).



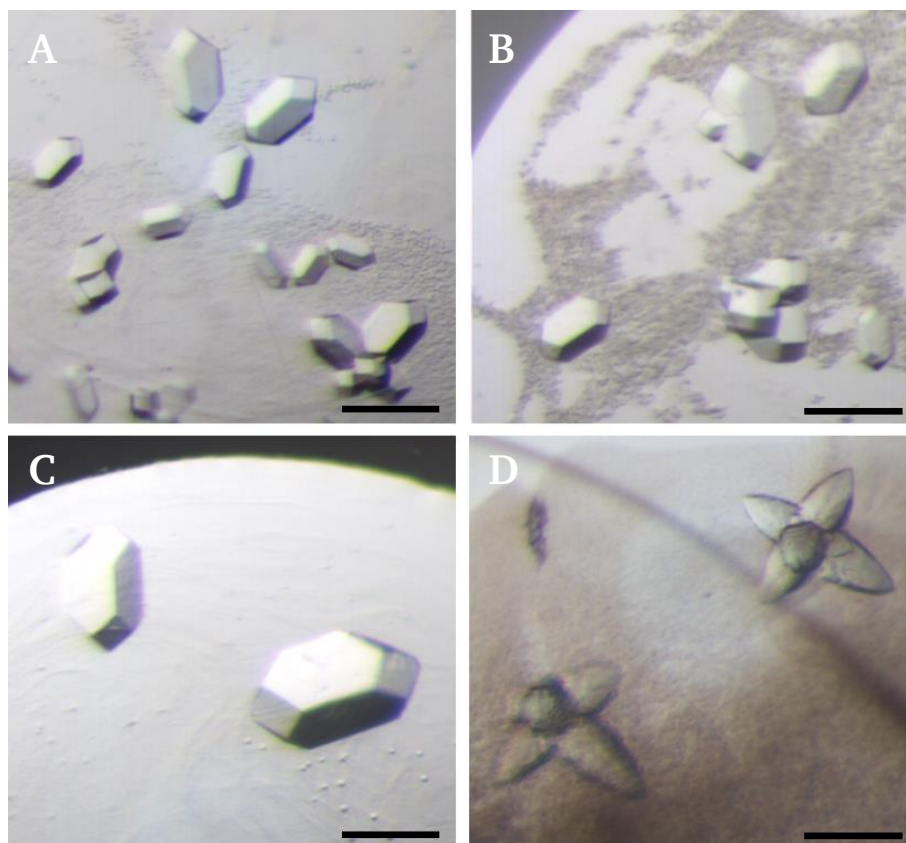
**Abbildung 41:** ESR-Spektren von Co-SOR (A), Ga-SOR (B), Mn-SOR (C) und Ni-SOR (D) mit Proteinkonzentrationen zwischen 270 und 344  $\mu$ M. Die Messungen wurden bei 7 K, 1 mT Amplitudenmodulation, 2 mW Mikrowellenleistung und 9,4 GHz durchgeführt.

Dies wurde in vorherigen Arbeiten sowohl bei der AaSOR-Wt als auch bei Eisenkontaminationen in SOR-Präparationen mit Austauschmetallen beobachtet (Urich *et al.*, 2004; Veith, 2011a). Die Intensitäten der Eisen und Kupfer-Signale unterschieden sich zwischen den Dialysepuffern der Mn-SOR und denen der übrigen Heterometall-SORs, obwohl für alle Präparationen die Dialyse im identischen Dialysepuffer durchgeführt wurde. Dies deutete auf eine von den Proben und den verwendeten Puffern unabhängige Kontaminationsquelle hin. Mit einem von Miguel Teixeira bereitgestellten Testpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,6) wurde versucht, die Herkunft der Verunreinigungen zu klären. Hierzu wurde ein ESR-Spektrum der Pufferlösung aufgenommen, auf die Anwesenheit von Eisen- und Kupfer-Signalen überprüft und mit den Spektren der für die Rückfaltung verwendeten Dialysepuffer verglichen (Abb. 42). Alle Puffer zeigten die gleichen Peaks bei  $g = 4,3$  und  $g \sim 2,0$  mit geringfügigen Unterschieden in ihrer Signalintensität. Da in den Dialysepuffern und in der von diesen unabhängig hergestellten Testlösung die gleichen Kontaminationen festgestellt wurden, ist davon auszugehen, dass die detektierten Metalle auf Kontaminationen des ESR-Systems oder der ESR-Röhrchen zurückzuführen sind und nicht von den untersuchten Heterometall-SORs ausgehen (persönliche Mitteilung von Miguel Teixeira).



**Abbildung 42:** Überlagerung der ESR-Spektren der für die SOR-Derivate verwendeten Dialysepuffer und des von Miguel Teixeira bereitgestellten Testpuffers (100 mM Tris/HCl, pH 7,6). Die Messungen wurden bei 7 K, 1 mT Amplitudenmodulation, 2 mW Mikrowellenleistung und 9,4 GHz durchgeführt.

Zur Identifikation von strukturellen Änderungen und Analyse der Metallzusammensetzung in den aktiven Zentren der Heterometall-SORs wurden diese kristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalysen untersucht. Vor der Kristallisation wurden die SOR-Präparationen mit den jeweiligen Metallsubstitutionen gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert und auf Konzentrationen von 13,3 mg/mL (Co-SOR), 14,1 mg/mL (Ga-SOR), 13,8 mg/mL (Mn-SOR) und 13,0 mg/mL (Ni-SOR) eingestellt. Mit einem automatisierten Screening wurden geeignete Kristallisationsbedingungen gesucht und bei positiven Resultate weiter optimiert (Tab. 15).



**Abbildung 43:** Kristalle der verschiedenen Heterometall-SORs. (A) Co-SOR, (B) Ni-SOR und (C) Mn-SOR kristallisiert in 0,1 M HEPES pH 7,5 / 1,0 M Natriumacetat / 5 mM Cadmiumsulfat. (D) Ga-SOR kristallisiert in 0,1 M Natriumacetat pH 4,8 / 0,2 M NaCl / 30 % [v/v] MPD. Die Größenbalken entsprechen 0,1 mm.

Alle Kristallisationen wurden bei 20 °C durchgeführt. Eine Kristallisation von Co-SOR, Mn-SOR und Ni-SOR gelang nur in Gegenwart von Cadmiumsulfat als Additiv in der Kristallisationslösung. Für die drei Präparationen wurde bereits nach 24 h eine Kristallbildung beobachtet. Kristallbildung und -wachstum setzten sich für weitere 72 h fort. Optimierungsversuche der Kristallisationsbedingungen blieben für die drei genannten SOR-Präparationen erfolglos, weshalb hexagonalen Kristalle mit einer Größe von etwa 0,1 mm aus dem initialen Screening für die Synchrotron-Bestrahlung verwendet wurden (Abb. 43 A,B,C). Die Kristallisation der Ga-SOR gelang ohne Zugabe von Schwermetall-Additiven. Im ersten Screening wurden in einen Natriumacetat-Puffer pH 4,6 mit 0,2 M NaCl und 30 % [v/v] MPD kleine Kristalle beobachtet. Durch Variation der pH-



Werte in einem Bereich von 4,2 bis 5,0 wurde bei einem pH von 4,8 nach 10 Tagen die Bildung von ca. 0,1 mm großen elliptischen Kristallen, die als sternförmige hexamere Strukturen angeordnet vorlagen, beobachtet (Abb. 43 D). Kristalle aller Heterometall-SORs wurden nach dem Transfer in die entsprechenden kryoprotektiven Lösungen (Tab. 15) in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Synchrotron-Bestrahlung gelagert.

**Tabelle 15:** Kristallisationsbedingungen und kryoprotektive Lösungen der AaSOR-Präparationen mit den jeweiligen Metallsubstitutionen.

Protein	Kristallisationsbedingung	Kryoprotektive Lösung
Co-SOR	0,1 M HEPES pH 7,5	0,1 M HEPES pH 7,5
	1,0 M Natriumacetat	1,0 M Natriumacetat
	0,005 M Cadmiumsulfat	0,005 M Cadmiumsulfat 25 % [v/v] Glycerin
Ga-SOR	0,1 M Natriumacetat pH 4,8	0,1 M Natriumacetat pH 4,8
	0,2 M NaCl	0,2 M NaCl
	30 % [v/v] MPD	30 % [v/v] MPD
Mn-SOR	0,1 M HEPES pH 7,5	0,1 M HEPES pH 7,5
	1,0 M Natriumacetat	1,0 M Natriumacetat
	0,005 M Cadmiumsulfat	0,005 M Cadmiumsulfat 25 % [v/v] Glycerin
Ni-SOR	0,1 M HEPES pH 7,5	0,1 M HEPES pH 7,5
	1,0 M Natriumacetat	1,0 M Natriumacetat
	0,005 M Cadmiumsulfat	0,005 M Cadmiumsulfat 25 % [v/v] Glycerin

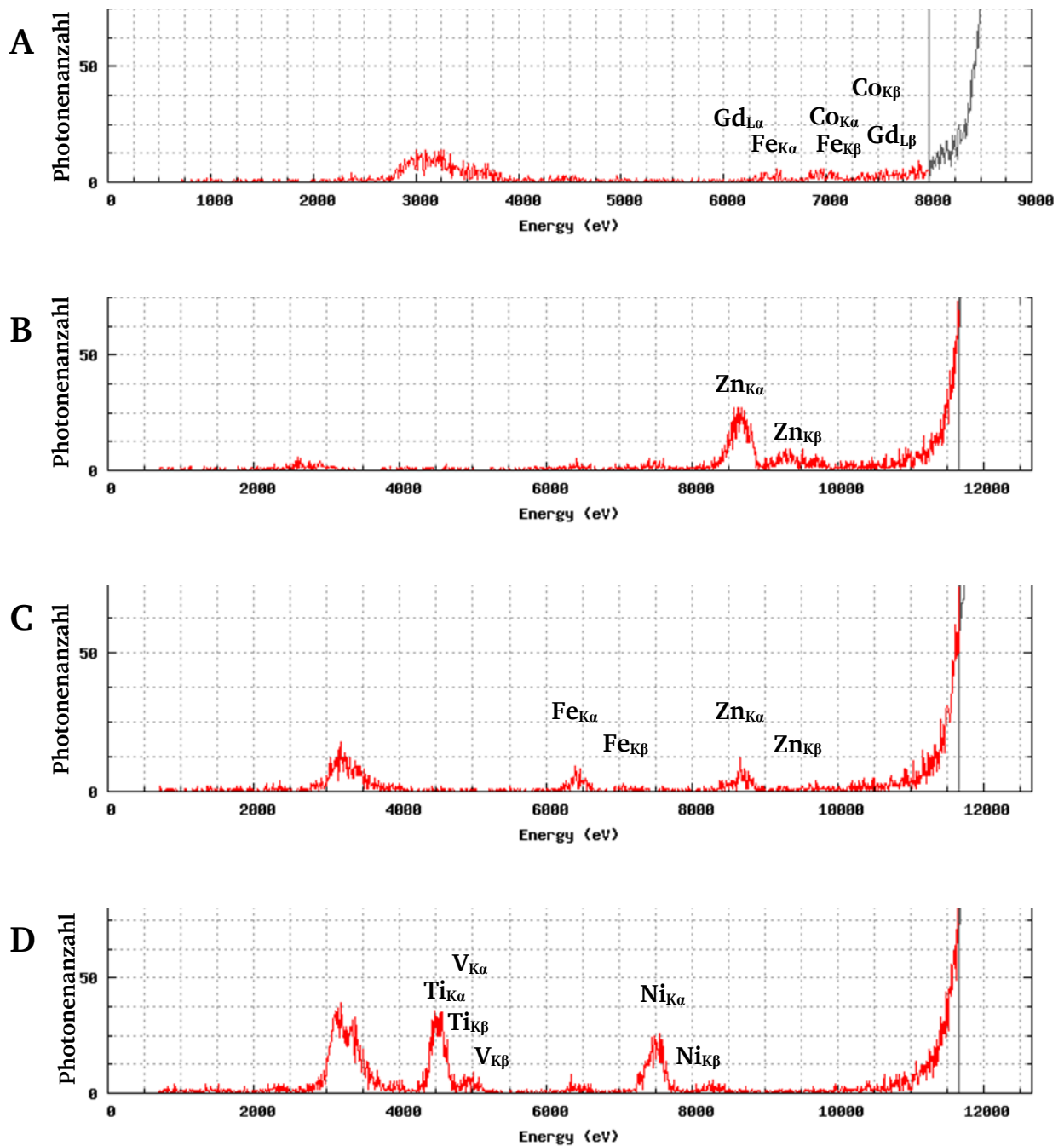
Die Daten der Röntgendiffraktion wurden von Carlos Frazão (ITQB, Oeiras, Portugal) gesammelt. Hierzu wurde für die Ni-SOR die Synchrotronstrahlenquelle I04 der Diamond Light Source (DLS, Oxfordshire, England) mit einer Wellenlänge von 0,9795 Å verwendet. Für Co-, Ga- und Mn-SOR kam die Strahlenquelle P14 des Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) zum Einsatz. Die genutzten Wellenlängen variierten dabei in Abhängigkeit des zu sammelnden Datensatzes einer anomalen Dispersion für die zu identifizierenden Metalle.

Die Analyse und Bearbeitung der Rohdaten sowie die Erstellung der initialen Kristallstrukturen wurde ebenfalls von Carlos Frazão durchgeführt. Die wichtigsten Diffraktionsdaten, kristallographischen Parameter und Statistiken zum *Refinement* der Heterometall-SORs sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Das *Refinement* und die Analysen der Metalle sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig abgeschlossen.

**Tabelle 16:** Vorläufige kristallographische Parameter, gesammelte Diffraktionsdaten und Statistiken zum *Refinement* der Kristallstrukturen von SOR-Derivaten mit Heterometallen. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung. Da aufgrund der Nutzung verschiedener Wellenlängen mehrere Datensätze zu den Kristallen der Heterometall-SORs existieren, wurde hier jeweils nur eine dieser Strukturen exemplarisch aufgeführt.

Parameter	Co-SOR	Ga-SOR	Mn-SOR	Ni-SOR
Quelle der Röntgenstrahlung	Petra-P14	Petra-P14	Petra-P14	Diamond I04
Wellenlänge (Å)	0,9763	1,1921	1,2651	0,9795
Raumgruppe	I4	I432	I4	I4
Parameter Elementarzelle (Å)	a = b = 162,41 c = 153,97	a = b = c = 158,88	a = b = 162,75 c = 154,10	a = b = 162,19 c = 153,76
Auflösung (Å)	111,74 - 1,85 (1,96 - 1,85)	112,34 - 1,75 (1,91 - 1,75)	65,81 - 1,95 (2,07 - 1,95)	76,88 - 2,15 (2,28 - 2,15)
Anzahl einzelner Intensitäten	335857	65240	287803	211878
Redundanz	3,48 (3,42)	37,7 (15,29)	6,92 (6,42)	3,48 (3,42)
I/ $\sigma$ (I)	8,90 (1,21)	26,16 (1,39)	10,52 (1,20)	8,01 (1,34)
R <sub>meas</sub> (%)	15,3 (131,3)	14,7 (209,0)	19,8 (179,6)	18,1 (104,1)
R <sub>pim</sub> (%)	6,96 (38,09)	2,09 (22,38)	6,24 (32,58)	8,48 (36,35)
R <sub>sym</sub> (%)	13,0 (110,9)	14,5 (202,0)	18,2 (164,9)	15,3 (87,7)
Vollständigkeit (%)	99,6 (99,0)	99,8 (99,7)	99,9 (99,5)	99,6 (99,0)
Untereinheiten pro asym. Einheit	6	1	6	6
Wilson B (Å <sup>2</sup> )	24	27	23	35
Struktur nach <i>Refinement</i>	1842 Aminosäuren 1309 Wassermoleküle 23 Cd <sup>2+</sup> 1 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	307 Aminosäuren 342 Wassermoleküle	1842 Aminosäuren 1087 Wassermoleküle 33 Cd <sup>2+</sup>	1842 Aminosäuren 716 Wassermoleküle
R <sub>work</sub> (%)	18,98	20,19	15,77	16,16
R <sub>free</sub> (%)	21,74	23,77	19,71	21,91
Average ADP (Å <sup>2</sup> )	26	24	30	27
Bonds RMSD (Å)	0,014	0,022	0,038	0,008
Angles RMSD (°)	1,066	1,045	1,097	1,084

Die Metallzusammensetzung in den Heterometall-SORs wurde zusätzlich mittels Röntgenfluoreszenzspektroskopie an jeweils einem Kristall untersucht. Das Spektrum der Co-SOR wurde mit 9.000 eV, das der übrigen Heterometall-SORs mit 12.658 eV an der Diamond Light Source (DLS, Oxfordshire, England) aufgenommen. Die Identifikation der jeweiligen Peaks erfolgte automatisiert mit PyMca (Solé *et al.*, 2007) anhand der Energien der metallspezifischen Röntgenfluoreszenz (Abb. 44).



**Abbildung 44:** Röntgenfluoreszenzspektren von Co-SOR (A), Ga-SOR (B), Mn-SOR (C) und Ni-SOR (D) und Ergebnisse der automatisierten Peak-Analyse mit PyMca am Diamond Synchrotron. Die X-Achse gibt die Energie der emittierten Photonen wieder. Die Y-Achse beschreibt die Intensität der Fluoreszenzröntgenstrahlung über die Photonenzahl.

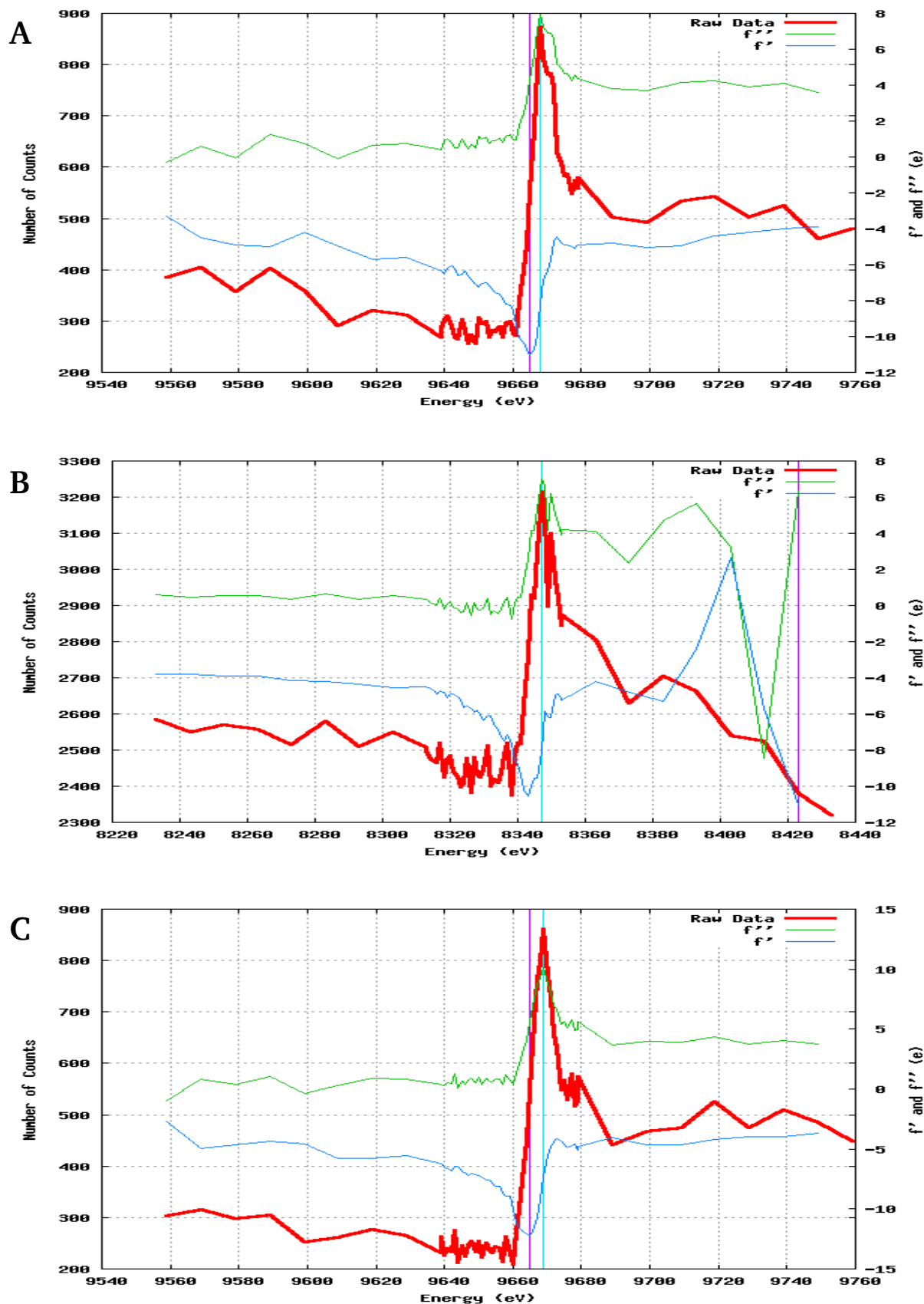
Die meisten Peaks der identifizierten Metalle in den Röntgenfluoreszenzspektren weisen eine äußerst geringe Signalintensität in Form der Photonenzahl auf (Abb. 44 + Tab. 17).

**Tabelle 17:** Automatisierte Peak-Identifikation der Röntgenfluoreszenzspektren mittels PyMca. Aufgelistet sind die untersuchten Heterometall-SORs, die identifizierten Metalle mit der Anzahl emittierter Photonen, der Typ der emittierten Strahlung sowie die erwarteten Emissionsenergien, auf denen die automatische Zuordnung der Peaks basierte.

SOR-Derivat	Metall	Anzahl Photonen	Emittierte Strahlung	Erwartete Emissionsenergie [eV]
Co-SOR	Co	111	K <sub>α</sub>	6930
			K <sub>β</sub>	7649
	Fe	102	K <sub>α</sub>	6404
			K <sub>β</sub>	7058
	Gd	64,6	L <sub>α</sub>	7478
			L <sub>β</sub>	8265
Ga-SOR	Zn	806	K <sub>α</sub>	8639
			K <sub>β</sub>	9572
Mn-SOR	Fe	80	K <sub>α</sub>	6404
			K <sub>β</sub>	7058
	Zn	90	K <sub>α</sub>	8639
			K <sub>β</sub>	9572
Ni-SOR	Ni	622	K <sub>α</sub>	7478
			K <sub>β</sub>	8265
	Ti	791	K <sub>α</sub>	4511
			K <sub>β</sub>	4932
	V	47	K <sub>α</sub>	4952
			K <sub>β</sub>	5427

Demnach enthielt der untersuchte Kristall der Co-SOR die Elemente Cobalt, Eisen und Gadolinium. Im Kristall der Ga-SOR wurde lediglich Zink eindeutig nachgewiesen. Der Kristall der Mn-SOR enthielt Eisen und Zink, wohingegen der Kristall der Ni-SOR die Elemente Nickel, Titan und Vanadium beinhaltete. Keines der Spektren ließ einen spezifischen Metalleinbau erkennen, wie es mit den hochreinen Präparationsbedingungen angestrebt wurde. Das bei der Rückfaltung verwendete Substitutionsmetall wurde nur bei Co-SOR und Ni-SOR nachgewiesen, nicht jedoch bei Ga-SOR und Mn-SOR. Die Emissionsenergien von Gallium und Mangan wären bei ca. 9224 eV (K<sub>α</sub>) und 10260 eV (K<sub>β</sub>) bzw. 5887 eV (K<sub>α</sub>) und 6490 eV (K<sub>β</sub>) im Fluoreszenzspektrum nachweisbar.

Zur Absicherung der Resultate wurden zusätzliche *Edge Scans* im Bereich der theoretischen K-Absorptionskanten der Substitutionsmetalle durchgeführt, um die Existenz der jeweiligen Metalle spezifischer zu überprüfen (Abb. 45).



**Abbildung 45:** *Edge Scans* im Bereich der theoretischen K-Absorptionskanten zum Nachweis von Eisen, Nickel oder Zink. Die X-Achse beschreibt die Energie der einfallenden Röntgenstrahlung in eV und die Y-Achse die Signalintensität. (A) Absorptionskante von Zink in der Ga-SOR. (B) Absorptionskante von Nickel in der Ni-SOR. (C) Absorptionskante von Zink in der Mn-SOR.

---

Auch hier wurden weder Mangan noch Gallium nachgewiesen (nicht dargestellt). Die *Edge Scans* von Ga-SOR und Ni-SOR hingegen zeigten ein deutliches Signal für Zink (*K-Edge*: 9,66 keV) bzw. Nickel (*K-edge*: 8,33 keV) und bestätigten das Vorkommen der Metalle in den Kristallen (Abb. 45 A+B). Auch das im Röntgenfluoreszenzspektrum der Mn-SOR gefundene Zink wurde nachgewiesen (Abb. 45 C). Cobalt und Eisen in der Co-SOR wurden durch die *Edge Scans* nicht gefunden (nicht dargestellt). Die entsprechenden Signalintensitäten im zugrundeliegenden Röntgenfluoreszenzspektrum waren jedoch auch sehr schwach und ließen lediglich einen sehr geringen Gehalt der Metalle vermuten (Abb. 44 A).

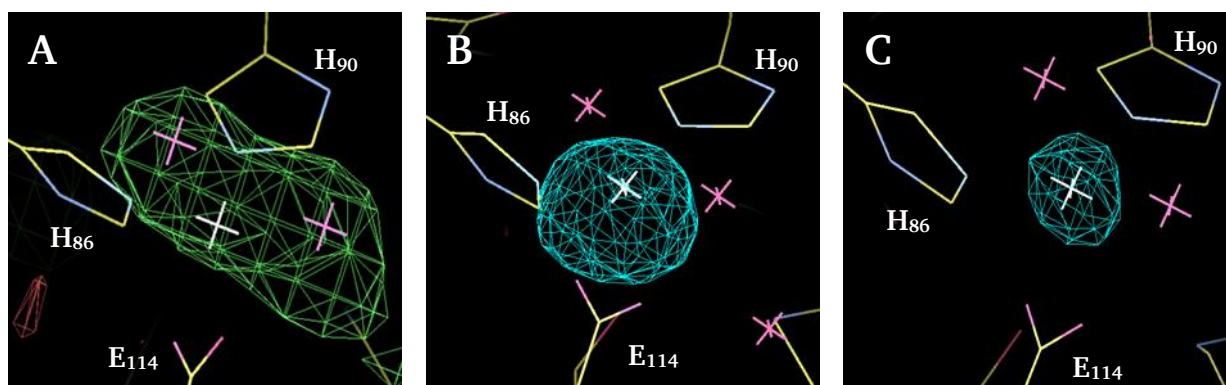
Die Röntgenfluoreszenzspektroskopie wurde zu einem späteren Zeitpunkt an der Strahlenquelle P14 des Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) von Carlos Frazão wiederholt. Die Auswertung der Spektren ist aktuell noch nicht abgeschlossen. Jedoch wurden erneut unterschiedlichste Metalle in den Kristallen der Heterometall-SORs nachgewiesen. Für die Mn-SOR wurden Spektren verschiedener Kristalle aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass die Mn-SOR-Kristalle unterschiedliche Metallzusammensetzungen aufweisen (persönliche Mitteilung von Carlos Frazão). Daher ist eine durch den Kristallisationsprozess bedingte Kontamination der Heterometall-SORs mit den nachgewiesenen Metallen denkbar.

Neben der Aufnahme von Röntgenfluoreszenzspektren und der Durchführung von *Edge Scans* wurde versucht, die Metallzusammensetzung in den Kristallen durch Röntgenstrukturanalysen zu spezifizieren. In Kombination mit anomalen Signalen können so entsprechende Metalle in der Kristallstruktur lokalisiert und identifiziert werden. Die Erstellung von anomalen Elektronendichtekarten beruht auf der anomalen Dispersion. Sie beschreibt eine Phasenänderung bei der Diffraktion von Röntgenstrahlung, die auftritt, wenn die Energie der einfallenden Röntgenstrahlung oberhalb der Absorptionskante des gesuchten Metalls liegt. Die Diffraktion der Photonen erfolgt dabei in einer geänderten Phase und unterscheidet sich von den restlichen Atomen in der Kristallstruktur. Bei den Röntgenstrukturanalysen wurden daher Wellenlängen genutzt, die oberhalb der K-Absorptionskanten der gesuchten Metalle lag. Die hier beschriebenen Untersuchungen beschreiben den aktuellen Stand der Analysen. Strukturanalysen und *Refinement* der jeweiligen Kristallstrukturen sind noch nicht abgeschlossen.

Für die Ni-SOR fand bislang nur eine erste Untersuchung der Kristallstruktur statt. Die Sammlung anomaler Daten an der Strahlenquelle P14 des Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) mit 8,40 keV bzw. 1,48 Å und somit oberhalb der theoretischen K-Absorptionskante von Nickel (8,33 keV) gelang aufgrund einer strukturellen Fehlordnung des verwendeten Kristalls nicht. Eine Identifikation des im aktiven Zentrum lokalisierten Metalls war daher nicht möglich. Die am Diamond Synchrotron aufgenommene  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarte zeigte, dass im Metallzentrum eine höhere Elektronendichte vorliegt, als es für das im Wildtyp vorkommende



Eisen der Fall wäre (Abb. 46 A). Dies deutet auf eine Substitution des Eisens gegen ein Element mit größerer Elektronenanzahl hin, wie es bei Nickel der Fall ist. Die Belegung des Metallzentrums mit Metall-Ionen beträgt 0,8 und somit 80 %. Daneben waren noch weitere Metall-Ionen in der Kristallstruktur erkennbar. Eine hohe Elektronendichte wurde an den funktionellen Gruppen von D<sub>85</sub>, E<sub>88</sub>, E<sub>118</sub> und E<sub>279</sub> gefunden, die alle an der Enzymoberfläche lokalisiert sind. Im Kristall bilden diese Aminosäure Kontaktstellen zwischen verschiedenen SOR-Holoenzymen.



**Abbildung 46:** Metallzentren in den vorläufigen Kristallstrukturen der Heterometall-SOR mit dem jeweiligen Metall-Ion (weißes Kreuz) und Wassermolekülen (rote Kreuze). (A) Metallzentrum der Ni-SOR. Der abgebildete Stand des *Refinements* basiert auf einem Eisen-Ion in der Metallbindestelle. Die positive Differenzelektronendichte in der  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarte ist als grünes Netz mit einem Konturierungslevel von  $3\sigma$  dargestellt. (B) Metallzentrum der Co-SOR mit der bei 7,75 keV aufgenommenen anomalen Differenzelektronendichtekarte und einem Konturierungslevel von  $6\sigma$ . (C) Metallzentrum der Ga-SOR mit der anomalen Differenzelektronendichtekarte (10,4 - 9,70 keV) und einem Konturierungslevel von  $6\sigma$ .

Das *Refinement* der Co-SOR ergab mit 1,0 eine vollständige Belegung der Metallbindungsstelle. Um zu überprüfen, ob entgegen der Resultate der Röntgenfluoreszenzspektroskopie und der *Edge Scans* doch signifikante Mengen Cobalt im aktiven Zentrum vorhanden sind, wurden an der Strahlenquelle ID-29 des ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, Frankreich) anomale Daten oberhalb der theoretischen Absorptionskante von Cobalt (7,71 keV) mit 7,75 keV bzw. 1,60 Å gesammelt. Hierbei war ein deutliches Signal an der Metallbindestelle im aktiven Zentrum zu erkennen (Abb. 46 B). Neben dem Metallzentrum deutet die  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarte in mehreren Untereinheiten auf zusätzlich komplexierte Metall-Ionen an den Aminosäuren E<sub>16</sub>, D<sub>85</sub>, E<sub>88</sub>, E<sub>118</sub>, E<sub>201</sub>, E<sub>240</sub>, E<sub>279</sub> und D<sub>282</sub> hin. Signale für Cobalt wurden an diesen Positionen nicht gefunden. Die meisten dieser Aminosäuren sind auf der Enzymoberfläche lokalisiert und einige davon wurden bereits in der Ni-SOR als Liganden potentieller Metall-Ionen beschrieben. Beide SOR-Derivate kristallisierten im gleichen Puffer, der unter anderem Cadmiumsulfat als Additiv enthielt. Es wurde vermutet, dass es sich bei den entdeckten Metall-Ionen um Cadmium handeln könnte, das an der Enzymoberfläche die Interaktion der Holoenzyme und deren Kristallisation begünstigt. Um diese These zu überprüfen

---

und Cadmium-Ionen (*K-edge* 26,7 keV bzw. 0,46 Å) in der Kristallstruktur nachweisen zu können, wurden an der Strahlenquelle P14 des Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) zusätzlich anomale Daten mit der maximal verfügbaren Energie von 12,70 keV gesammelt. Die anomale Differenzelektronendichtekarte zeigte eindeutige Signale an den funktionellen Gruppen der beschriebenen Aminosäuren, weshalb die Atome an diesen Positionen als Cadmium modelliert wurden. Auch am Ort der Metallbindestelle im aktiven Zentrum war ein Signal in der anomalen Differenzelektronendichtekarte erkennbar, was auf eine partielle Besetzung des Metallzentrums mit Cobalt hindeutet (persönliche Mitteilung von Carlos Frazão).

Auch in der Kristallstruktur der Mn-SOR wies die  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarte auf komplexierte Metall-Ionen an den Aminosäuren E<sub>16</sub>, D<sub>85</sub>, E<sub>88</sub>, E<sub>118</sub>, E<sub>201</sub>, E<sub>240</sub>, E<sub>279</sub> und D<sub>282</sub> in mehreren Untereinheiten hin. Das bisherige *Refinement* ergab eine vollständige Belegung der Metallbindungsstelle im aktiven Zentrum. Zur Identifikation der Metall-Spezies wurden an der Strahlenquelle P14 des Deutsche Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) anomale Daten mit 6,40 keV, 6,70 keV, 7,30 keV und 9,80 keV gesammelt. Bei der Suche wurden die relevanten Metalle Mangan (*K-edge* 6,54 keV), Eisen (*K-edge* 7,11 keV), und Zink (*K-edge* 9,66 keV) abgedeckt. Eine eindeutige Zuordnung wurde bislang noch nicht vorgenommen. Die Belegung der Metallbindungsstelle durch ein weiteres von Mangan verschiedenes Metall scheint jedoch wahrscheinlich (persönliche Mitteilung von Carlos Frazão).

Die Kristallisation der Ga-SOR gelang ohne Cadmiumsulfat als Additiv. Auch in der  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarte sind neben dem Metallzentrum keine Hinweise auf komplexierte Metall-Ionen erkennbar, wie es bei den anderen SOR-Derivaten der Fall ist. Das bisherige *Refinement* der Kristallstruktur ergab eine vollständige Belegung der Metallbindestelle. Das anomale Signal in der anomalen Differenzelektronendichtekarte (10,4 - 9,70 keV) bestätigt die Anwesenheit von Gallium in der Metallbindestelle (Abb. 46 C). Eine mit 9,70 keV aufgenommene anomale Differenzelektronendichtekarte weist jedoch auf die Existenz eines weiteren Metalls im aktiven Zentrum hin. Eine eindeutige Zuordnung und eine Bestimmung der Belegungsanteile für die Metallbindestelle sind jedoch mit den bisherigen Daten nicht möglich. Es wurden weitere Röntgenfluoreszenzspektren aufgenommen, die bei der weiteren Interpretation der Daten hilfreich sein könnten, bislang aber nicht final ausgewertet sind (persönliche Mitteilung von Carlos Frazão). Die anomalen Differenzelektronendichtekarten der untersuchten Heterometall-SORs implizieren, dass die eingesetzten Substitutionsmetalle im aktiven Zentrum der SORs vorkommen. Jedoch scheinen noch weitere Metalle die dort befindliche Metallbindungsstelle zu besetzen, darunter auch das im Kristallisationspuffer enthaltende Cadmium. Röntgenfluoreszenzspektroskopie und *Edge Scans* wiesen zudem auf die Anwesenheit weitere Metalle wie Zink und das im AaSOR-Wt enthaltene Eisen hin. Röntgenfluoreszenzspektren von Mn-SOR-Kristallen ließen eine variable

Metallzusammensetzung in den verschiedenen Kristallen erkennen. Trotz hochreiner Präparationsbedingungen wurden durch die verschiedenen Analysetechniken und Kristallstrukturen in allen untersuchten SOR-Derivaten unerwünschte Metalle nachgewiesen. Wegen dieser vermutlich multiplen Besetzung der Metallbindungsstellen wurde von einer Vermessung der Abstände zu den Liganden und der damit einhergehenden Untersuchung potentieller struktureller Änderungen bislang abgesehen. Unklar war, ob die beschriebenen Kontaminationen bereits bei der Isolation der Heterometall-SORs und der Durchführung der Aktivitätsbestimmungen vorlagen oder sie erst durch den Prozess der Kristallisation entstanden. Da weder für das automatisierte Screening noch für die weiteren optimierten Kristallisationsschritte hochreine Chemikalien zur Verfügung standen, wäre eine Kontamination im Rahmen der Kristallisierung vorstellbar. Auch Kontaminationen der für die Isolation der Kristalle verwendeten *loops* würden die Nachweise nie verwendeter Metalle wie Titan oder Vanadium bei der Röntgenfluoreszenzspektroskopie erklären. Um die Theorie der Kontaminationen durch verwendete *loops* und den Kristallisierungsprozess zu prüfen, wurde mit den für die Kristallisation verwendeten Proteinlösungen eine Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) durchgeführt. Dabei wurde ein allgemeines Screening der im Puffer und der Proteinlösung enthaltenen Elemente durchgeführt sowie eine Quantifizierung von Eisen, Zink und der verwendeten Austauschmetalle (Tab. 18). Analysiert wurden jeweils 12,5 und 2,5  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Proteinlösung (entspricht 4,3 - 5,9 nmol bzw. 0,8 - 1 nmol SOR-Untereinheit). Als Referenz diente der verwendete Dialysepuffer. Weiterhin fand eine Kontrollmessung mit 4 nmol der genutzten hochreinen Metallsalze im Dialysepuffer statt. Die Messung der Ga-SOR erfolgte nachträglich in einer zweiten Messung und wird daher gesondert aufgeführt.

**Tabelle 18:** Quantifizierung von Eisen, Zink und der eingesetzten Austauschmetalle in 12,5 und 2,5  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Proteinlösungen von Co-, Ga-, Mn- und Ni-SOR. Die Nachweisgrenze der durchgeführten Analyse lag bei 0,03  $\mu\text{g}/500\mu\text{L}$  Probevolumen.

SOR-Derivat	$^{59}\text{Co}$ [ $\mu\text{g}$ ]	$^{55}\text{Mn}$ [ $\mu\text{g}$ ]	$^{60}\text{Ni}$ [ $\mu\text{g}$ ]	$^{71}\text{Ga}$ [ $\mu\text{g}$ ]	$^{57}\text{Fe}$ [ $\mu\text{g}$ ]	$^{66}\text{Zn}$ [ $\mu\text{g}$ ]
Co-SOR 12,5 $\mu\text{L}$	<b>0,30</b>	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<b>0,02</b>
Co-SOR 2,5 $\mu\text{L}$	<b>0,05</b>	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<b>0,01</b>
Mn-SOR 12,5 $\mu\text{L}$	<0,03	<b>0,32</b>	<0,03	<0,03	<0,03	<b>0,04</b>
Mn-SOR 2,5 $\mu\text{L}$	<0,03	<b>0,05</b>	<0,03	<0,03	<0,03	<b>0,04</b>
Ni-SOR 12,5 $\mu\text{L}$	<0,03	<0,03	<b>0,37</b>	<0,03	<0,03	<0,03
Ni-SOR 2,5 $\mu\text{L}$	<0,03	<0,03	<b>0,11</b>	<0,03	<0,03	<b>0,03</b>
Ga-SOR 12,5 $\mu\text{L}$	<b>0,01</b>	<b>0,07</b>	<b>0,53</b>	<b>0,68</b>	<b>4,94</b>	<b>0,05</b>
Ga-SOR 2,5 $\mu\text{L}$	0	0	0	<b>0,17</b>	0	0

---

Bezüglich der bei der Röntgenfluoreszenzspektroskopie nachgewiesenen Elemente Gadolinium, Titan, Vanadium oder auch anderer Elemente zeigte keine der untersuchten Proben im *Screening* erhöhte Messwerte (nicht dargestellt). Die Analysen von Co-, Mn- und Ni-SOR ergaben, in Abhängigkeit des eingesetzten Probenvolumens, einen Gehalt von 0,05 - 0,11  $\mu\text{g}$  bzw. 0,30 - 0,37  $\mu\text{g}$  des entsprechenden Austauschmetalls. Im Mittel ergeben sich hieraus theoretische Beladungen des Enzyms mit 1,0 - 1,8 nmol Metall/nmol SOR-Untereinheit. Für die drei SOR-Derivate wurde lediglich das beabsichtigte Substitutionsmetall, nicht aber Kontaminationen mit einem anderen Austauschmetall festgestellt. Eisen, wie es etwa bei der ESR- oder Röntgenfluoreszenzspektroskopie gefunden worden ist, wurde in keinem der Testansätze nachgewiesen. Lediglich Zink, was einen Inhibitor der SOR darstellt, war bei allen drei SOR-Derivaten und in den zugehörigen Dialysepuffern vorhanden. Mit Ausnahme der Ni-SOR bei einem Probenvolumen von 12,5  $\mu\text{L}$  wurden dabei Mengen von 0,01 - 0,04  $\mu\text{g}$  Zink nachgewiesen. Hiervon abweichende Resultate traten für die nachträglich durchgeführte Messung der Ga-SOR auf. Sind in der 2,5  $\mu\text{L}$  Probenvolumen umfassenden Analyse ausschließlich 0,17  $\mu\text{g}$  Gallium detektiert worden, so wurden in der Messung mit 12,5  $\mu\text{L}$  Probenvolumen neben 0,68  $\mu\text{g}$  Gallium auch Eisen, Zink und die Austauschmetalle Cobalt, Mangan und Nickel festgestellt. Bezogen auf die Beladung des Enzyms mit Gallium resultiert daraus eine gemittelte Beladung mit 2,3 nmol Gallium/nmol SOR-Untereinheit. Die detektierten 4,94  $\mu\text{g}$  Eisen würden einer Beladung von 15,5 nmol Eisen/nmol SOR-Untereinheit entsprechen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach der Synthese der AaSOR in *E. coli* oder nach der in Gegenwart von Eisen erfolgten Rückfaltung der SOR nie eine Eisenbeladung über 2 nmol Eisen/SOR-Untereinheit festgestellt. Daher können die für das Probenvolumen von 12,5  $\mu\text{L}$  ermittelten Messwerte angezweifelt werden, zumal im Probenvolumen von 2,5  $\mu\text{L}$  abzüglich Referenzlösung, mit Ausnahme von Gallium, keines der anderen Austauschmetalle festgestellt wurde.

Die Ergebnisse der mitgeführten Kontrollreaktionen ermöglichten eine bessere Interpretation der Daten (Tab. 19). In den Ansätzen mit Cobalt(II)-nitrat, Mangan(II)-acetat und Nickel(II)-nitrat wurden 0,42  $\mu\text{g}$  Cobalt (7,2 nmol), 0,40  $\mu\text{g}$  Mangan (6,8 nmol) bzw. 0,25  $\mu\text{g}$  Nickel (4,5 nmol) festgestellt. Damit lagen die detektierten Mengen der Metalle in etwa im Bereich der eingesetzten Menge von 4 nmol. Auch 0,10 bzw. 0,04  $\mu\text{g}$  Zink wurden in den Cobalt(II)-nitrat und Mangan(II)-acetat enthaltenen Lösungen gefunden. Die Kontrollreaktion mit 4 nmol hochreinem Ga(III)-chlorid hingegen wies neben 2,26  $\mu\text{g}$  (32 nmol) Gallium messbare Mengen aller untersuchten Metalle auf, insbesondere 8,65  $\mu\text{g}$  Nickel (147 nmol), 0,74  $\mu\text{g}$  Eisen (13,3 nmol) und 0,81  $\mu\text{g}$  Zink (12,4 nmol). Somit überstieg die detektierte Menge Gallium die eingesetzte Menge von 4 nmol um das Achtfache. In Kombination mit den hohen Mengen an Kontaminanten lässt dies auf eine fehlerhafte Messung der Ga-SOR schließen, zumal das eingesetzte Gallium die Komponente mit

dem höchsten Reinheitsgrad (7N) darstellt und die geringsten Kontaminationen erwarten lässt. Eine zuverlässige Aussage über den Gehalt an Gallium in der Ga-SOR-Lösung ist daher nicht möglich. Aus Zeitgründen war es nicht möglich, die ICP-Messung der Ga-SOR zu wiederholen. Sie sollte jedoch aufgrund der erheblichen Unterschiede zu den Messungen von Co-, Mn- und Ni-SOR erneut durchgeführt werden.

**Tabelle 19:** Quantifizierung der Mengen von Co, Ga, Mn, Ni; Fe und Zn in einem Kontrollansatz, der 4 nmol bei der Rückfaltung eingesetzten Substitutionsmetalle im verwendeten Dialysepuffer enthält. Die Nachweisgrenze der durchgeführten Analyse lag bei 0,03 µg/500µL Probevolumen.

SOR-Derivat	<sup>59</sup> Co [µg]	<sup>55</sup> Mn [µg]	<sup>60</sup> Ni [µg]	<sup>71</sup> Ga [µg]	<sup>57</sup> Fe [µg]	<sup>66</sup> Zn [µg]
Puffer + Co	0,42	-	-	-	-	0,10
Puffer + Mn	-	0,40	-	-	-	0,04
Puffer + Ni	-	-	0,25	-	-	-
Puffer + Ga	0,01	0,02	8,65	2,26	0,74	0,81

### 6.3. Diskussion

Ob der für das mononukleäre Eisenzentrum beobachtete Wechsel des Redoxzustands von Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> einen essentiellen Schritt bei der Katalyse darstellt, wurde durch die Rückfaltung denaturierter AaSOR *inclusion bodies* und dem Einbau der Nichteisenmetalle Cobalt, Gallium, Mangan und Nickel untersucht. Zur Vermeidung von Metallkontaminationen erfolgten die Rückfaltungen unter hochreinen Bedingungen und ausschließlich mit Metallen hoher Reinheit. Alle SOR-Derivate waren enzymatisch aktiv. Die Co-SOR besaß, verglichen mit einer in Gegenwart von Eisen rückgefalteten SOR, etwa 20 % Aktivität und damit die höchste Aktivität der Heterometall-SORs, gefolgt von der Ga-SOR mit ca. 10 % Oxygenase- und lediglich 1% Reduktaseaktivität. Mn- und Ni-SOR wiesen mit ca. 3 % bzw. 2 % Oxygenase- und einer kaum feststellbaren Reduktaseaktivität die geringsten enzymatischen Aktivitäten auf. Von besonderem Interesse ist die beobachtete Aktivität der Ga-SOR. Das Postübergangsmetall Gallium besitzt einen ähnlichen Ionenradius und eine vergleichbare Ladung wie Fe<sup>3+</sup> und wird häufig als nicht redoxaktives Metall zur Substitution von Fe<sup>3+</sup> eingesetzt (Merx & Averill, 1998). Eine Aktivität der SOR mit Gallium im aktiven Zentrum impliziert, dass der für Eisen beobachtete Wechsel des Redoxzustands kein essentielles Kriterium des Reaktionsmechanismus darstellt. Die Grundstruktur der SOR wird bei Denaturierung und Rückfaltung von *inclusion bodies* nicht beeinflusst. Elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten, dass zwischen nativer AaSOR-Wt und rückgefalteter SOR-Spezies morphologisch kein Unterschied erkennbar ist. Beide erscheinen als globuläre Partikel, die das 24 Untereinheiten umfassende Holoenzym repräsentieren. Auch die CD-

---

Spektroskopie wies auf eine vergleichbare Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente von rekombinanter AaSOR-Wt und SOR-Derivaten hin. Temperaturabhängige Denaturierungskurven gaben keinen Hinweis auf Stabilitätsunterschiede. Auch die Kristallstrukturen der SOR-Derivate ließen keine Abweichungen in der grundlegenden Proteinstruktur erkennen.

Der Redoxzustand der Substitutionsmetalle wurde mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie untersucht. Das Spektrum der Co-SOR zeigte das für *high spin*  $\text{Co}^{2+}$ -Spezies typische Signal bei  $g \sim 6,4$  mit Hyperfeinaufspaltung. Vergleichbare ESR-Signale wurden bereits bei einer cobalthaltigen Quercetinase aus *Streptomyces sp.* beobachtet (Merkens *et al.*, 2008). Eine Hyperfeinaufspaltung (oder auch Hyperfeinkopplung) des ESR-Signals tritt auf, wenn der Kern eines Liganden ein magnetisches Moment besitzt und damit das ungepaarte Elektron beeinflusst (Huheey *et al.*, 2012). Während das Signal der Hyperfeinaufspaltung in einer früheren Arbeit nach Inkubation mit Schwefel bei 80 °C verschwand (Veith, 2011a), blieb es in dieser Arbeit erhalten. Die damals als Ursache vermuteten strukturellen Änderungen des Ligandenumfelds während der Katalyse können somit nicht bestätigt werden. Für Cobalt fand kein Wechsel des Redoxzustands statt, da reduzierte  $\text{Co}^{1+}$ -Spezies aufgrund nicht vorhandener ungepaarter Elektronen kein ESR-Signal aufweisen würden. Das ESR-Spektrum der Mn-SOR wies für  $\text{Mn}^{2+}$ -Spezies typische Signale bei  $g \sim 6,0$ ,  $g \sim 3,3$  und  $g \sim 2,2$  auf (Gaffney, 2001). Auch hier fand kein durch die Katalyse bedingter Redoxwechsel statt, da reduzierte  $\text{Mn}^{1+}$ -Spezies ebenfalls kein ESR-Signal zeigen würden. Ga- und Ni-SOR wiesen weder im unbehandelten Zustand, noch nach Inkubation mit Schwefel bei 80 °C ein den beiden Metallen zuzuordnendes ESR-Signal auf, was zeigt, dass auch hier kein Redoxwechsel erfolgte. Für  $\text{Ga}^{3+}$  als diamagnetisches, redoxinaktives Metall wurde dieses Verhalten erwartet. Somit fand für keines der verwendeten Heterometalle eine Änderung des Redoxzustands statt.

Neben den beschriebenen Beobachtungen wiesen sowohl die ESR-Spektren der SOR-Derivate vor und nach der Katalyse, als auch die Spektren der verwendeten Dialysepuffer Signale bei  $g = 4,3$  und  $g \sim 2,0$  auf, die die Existenz von  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Spezies anzeigen. Entgegen früherer Experimente führte jedoch weder die Inkubation mit Schwefel bei 80 °C, noch eine Reduktion mit Dithionit zur Reduktion des Eisens und damit einhergehend zu einer deutlichen Verringerung der Signalintensität des Signals bei  $g = 4,3$  (Urich *et al.*, 2004; Veith, 2011a). Dies deutete auf eine von den Proben und den verwendeten Puffern unabhängige Kontaminationsquelle hin. Unterstützt wird diese These von der Beobachtung, dass die Intensitäten der  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Signale in den Dialysepuffern variierten, obwohl diese einer identischen Charge entsprangen. Die Analyse einer von Miguel Teixeira bereitgestellten Testlösung (100 mM Tris/HCl, pH 7,6) bestätigte diese Vermutung, da hier identische Signale bei  $g = 4,3$  und  $g \sim 2,0$  detektiert wurden. Ursache der in den Spektren beobachteten  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Signale scheint demnach eine externe Kontamination



---

des ESR-Systems oder der ESR-Röhrchen gewesen zu sein (persönliche Mitteilung von Miguel Teixeira). Dass die gemessenen Aktivitäten der SOR-Derivate auf Restmengen Eisen im aktiven Zentrum zurückzuführen sind, ist daher unwahrscheinlich. Auch spricht gegen eine durch Eisenkontaminationen bedingte Aktivität, dass die Intensitäten der jeweiligen Eisensignale nicht mit den ermittelten Aktivitäten der SOR-Derivate korreliert. Trotz deutlich höherer Aktivitäten weisen Co- und Ga-SOR, verglichen mit Ni- und Mn-SOR, keine entsprechend stärkeren Signale bei  $g = 4,3$  auf. Die Resultate legen daher nah, dass die ermittelten Aktivitäten der SOR-Derivate tatsächlich auf dem Einbau der entsprechenden Heterometalle beruhen und der für den Wildtyp beobachtete Wechsel des Redoxzustands keinen essentiellen Bestandteil der Katalyse und des Reaktionsmechanismus darstellt.

Die Ergebnisse der Analysen von SOR-Derivat-Kristallen mittels Röntgenfluoreszenzspektroskopie standen nicht im Einklang mit den Resultaten der ESR-Spektroskopie. Ein spezifischer Metalleinbau ohne Kontaminationen, wie es durch die hochreinen Präparationsbedingungen angestrebt wurde, war für keines der untersuchten SOR-Derivate nachweisbar. Nur Co- und Ni-SOR zeigten Signale des für die Rückfaltung eingesetzten Substitutionsmetalls. Neben äußerst geringe Mengen Cobalt deutete das Röntgenfluoreszenzspektrum der Co-SOR zusätzlich auf ähnlich geringe Mengen Eisen und Gadolinium hin. Das Spektrum der Ni-SOR wies neben einem vergleichsweise deutlichen Nickel-Peak auch Signale für Titan und Vanadium auf. Bei einer Analyse der Ga-SOR wurde keinerlei Gallium gefunden, sondern lediglich ein distinktes Signal für Zink, das allgemein als Inhibitor der SOR bekannt ist (Veith, 2011b). Auch das Spektrum des untersuchten Mn-SOR-Kristalls ließ kein Signal für Mangan, sondern lediglich schwache Signale für Eisen und Zink erkennen. Zur Absicherung der Resultate durchgeführte *Edge Scans* im Bereich der theoretischen K-Absorptionskanten der Substitutionsmetalle bestätigten die Existenz von Zink im Kristall der Ga-SOR und Nickel im Kristall der Ni-SOR. Mangan und Gallium wurden für die entsprechenden SOR-Derivate nicht festgestellt. Das im Röntgenfluoreszenzspektrum der Co-SOR gefundene Eisen und Cobalt wurde in den *Edge Scans* nicht nachgewiesen. Diese Beobachtungen können nicht mit den Resultaten der ESR-Spektroskopie in Einklang gebracht werden. Dort wurden sowohl für Cobalt als auch Mangan deutliche Signale festgestellt, ohne vergleichbar starke Signale für Eisen aufzuweisen. Die Anwesenheit von Zink kann anhand der ESR-Spektren jedoch nicht ausgeschlossen werden, da dieses im Oxidationszustand  $Zn^{2+}$  diamagnetisch ist und kein ESR-Signal aufweist. Zink fungiert jedoch ausschließlich als Inhibitor der SOR. Die mögliche Anwesenheit von Zink in der Ga-SOR und Mn-SOR würde demnach die Aussagekraft der Experimente nicht beeinträchtigen, da es selbst keinen aktivitätssteigernden Effekt ausüben kann. Die Vorkommen von Gadolinium, Titan und Vanadium, die weder bei der Rückfaltung noch anderen Experimenten zum Einsatz kamen, lassen sich durch potentielle Kontaminationen der



---

verschiedenen *loops* erklären, mit denen die jeweiligen Kristalle präpariert wurden (persönliche Mitteilung von Carlos Frazão). Eine spätere Wiederholung der Röntgenfluoreszenzspektroskopie, unter anderem mit mehreren Kristallen der Mn-SOR, ergab, dass die untersuchten Kristalle in ihrer Metallzusammensetzung teils deutlich variierten. Die neben den Substitutionsmetallen in den Röntgenfluoreszenzspektren der Heterometall-SORs detektierten Elemente wie Gadolinium, Titan oder Vanadium scheinen somit eine durch den Kristallisationsprozess oder die Kristallpräparation bedingte Kontamination darzustellen und keine *ab initio* enthaltenen Kontaminanten der präparierten SOR-Derivate zu sein. ICP-Analysen bestätigten diese Vermutung, da keines der SOR-Derivate erhöhte Werte eines dieser Metalle aufwies.

Die röntgenkristallographischen Untersuchungen der kristallisierten Heterometall-SORs lieferten ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Metallzusammensetzung im aktiven Zentrum. Die Bildung geeigneter Kristalle von Co-SOR, Mn-SOR und Ni-SOR gelang nur unter Zusatz von Cadmiumsulfat als Additiv zur Kristallisationslösung, was auch in den jeweiligen Kristallstrukturen nachzuweisen war. Am Beispiel der Co-SOR wurde durch die anomale Differenzelektronendichtekarte bestätigt, dass Cadmium-Ionen an mehreren Stellen in der SOR komplexiert werden und zusammen mit Cobalt auch das Metallzentrum besetzt haben. Für die Mn-SOR fand keine eindeutige Charakterisierung der Metalle im aktiven Zentrum statt. Eine Besetzung mit mehreren Metallen scheint jedoch wahrscheinlich zu sein. Die anomalen Differenzelektronendichtekarten verifizierten die Existenz von Gallium im aktiven Zentrum der Ga-SOR, wiesen jedoch auch ein Vorkommen eines weiteren, nicht näher identifizierten Metalls hin. Für die Ni-SOR wurden bislang keine anomalen Daten gesammelt. Die  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarte gab jedoch erste Hinweise, dass im Metallzentrum eine höhere Elektronendichte vorliegt, als es für das im Wildtyp vorkommende Eisen der Fall wäre. Die im Röntgenfluoreszenzspektrum nachgewiesenen Metalle Titan und Vanadium besitzen eine geringere Elektronenanzahl als Eisen und scheiden daher aus. Ein Austausch gegen das im Spektrum identifizierte Nickel ist daher als wahrscheinlich anzunehmen. Ob mehrere Metalle im aktiven Zentrum vorliegen, konnte bislang nicht geklärt werden. Die Existenz von Metallen im aktiven Zentrum, die nicht als Substitutionsmetall eingesetzt wurden, lässt darauf schließen, dass die in den Kristallisationslösungen vorhandenen Metallionen noch unbesetzte Bindungsstellen der aktiven Zentren besetzen können. Warum die in den Kristallen gefundenen Substitutionsmetalle nicht durch Röntgenfluoreszenzspektroskopie identifiziert wurden, bleibt jedoch unklar.

Einen Beleg für den spezifischen Einbau der Substitutionsmetalle in Co-, Mn- und Ni-SOR lieferten ICP-Analysen der für die Kristallisation eingesetzten Proteinlösungen. Keine der bei den Röntgenfluoreszenzspektroskopien oder in den Kristallstrukturen gefundenen Kontaminationen ist dabei in erhöhten Mengen detektiert worden. Dies bestätigt, dass die bei der ESR-Spektroskopie

---

und den Kristallanalysen gefundenen Kontaminationen nicht in den Proteinlösungen der unter hochreinen Bedingungen präparierten SOR-Derivate vorliegen. Nur Zink wurde in geringen Mengen in fast allen SOR-Präparationen detektiert, was aufgrund seiner inhibitorischen Funktion jedoch keinen aktivitätssteigernden Effekt auf die SOR ausübt und so die durch die Substitutionsmetalle bedingte Aktivität nicht verfälscht. Fraglich ist jedoch, weshalb Zink in den untersuchten Lösungen vorhanden war, da Chelex 100 erwiesenermaßen effektiv zur Komplexierung von Zink aus Umweltproben und biologischen Materialien genutzt werden kann (Kingston & Greenberg, 1984; Pella *et al.*, 1983). Die Beladungen des Enzyms mit den eingesetzten Heterometallen betrug im Mittel zwischen 1,0 - 1,8 nmol Metall/nmol SOR-Untereinheit. Entgegen der Analyse von Co-, Mn- und Ni-SOR wurden bei der Messung der Ga-SOR neben Gallium auch Eisen, Zink und die Austauschmetalle Cobalt, Mangan und Nickel festgestellt. Da auch die Resultate einer 4 nmol Ga(III)-chlorid enthaltenden Kontrollreaktion nicht im Einklang mit den eingesetzten Metallmengen stand, wurde von einer fehlerhaften Messreihe ausgegangen. Aus Zeitgründen konnten die Messungen nicht wiederholt werden, weshalb die bestehenden Daten keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die Metallzusammensetzung und den Gehalt an Gallium in der Ga-SOR zulassen.

Die Analysen zeigen in ihrer Gesamtheit, dass die anfangs hochreinen Präparationsbedingungen durch den Kristallisationsprozess und die weiteren Analysen nicht aufrechterhalten werden konnten. Da weder für das automatisierte Screening noch für die weiteren optimierten Kristallisationsschritte hochreine Chemikalien zur Verfügung standen, ist eine Kontamination im Rahmen der Kristallisierung und der Kristallpräparation als wahrscheinlichste Ursache anzusehen. Dies zeigen unter anderem die variablen Metallzusammensetzungen in unterschiedlichen Mn-SOR-Kristallen. ICP-Messungen der noch nicht weiter prozessierten Heterometall-SORs ließen neben Zink keine weiteren Kontaminationen in Co-, Mn- und Ni-SOR erkennen. Auch die vollständige Inaktivität der metallfreien SOR, die unter identischen Bedingungen rückgefaltet wurde (Abb. 36), belegt, dass die Aktivitäten der Heterometall-SORs nicht auf Eisenkontaminationen im aktiven Zentrum beruhen können, sondern durch das eingebrachte Substitutionsmetall bedingt werden. Der nicht stattgefundene Wechsel des Oxidationszustands der enzymatisch aktiven Heterometall-SORs lässt die Schlussfolgerung zu, dass der für Eisen in der AaSOR-Wt beobachtete Redoxwechsel kein essentielles Kriterium der SOR-Reaktion darstellt.

---

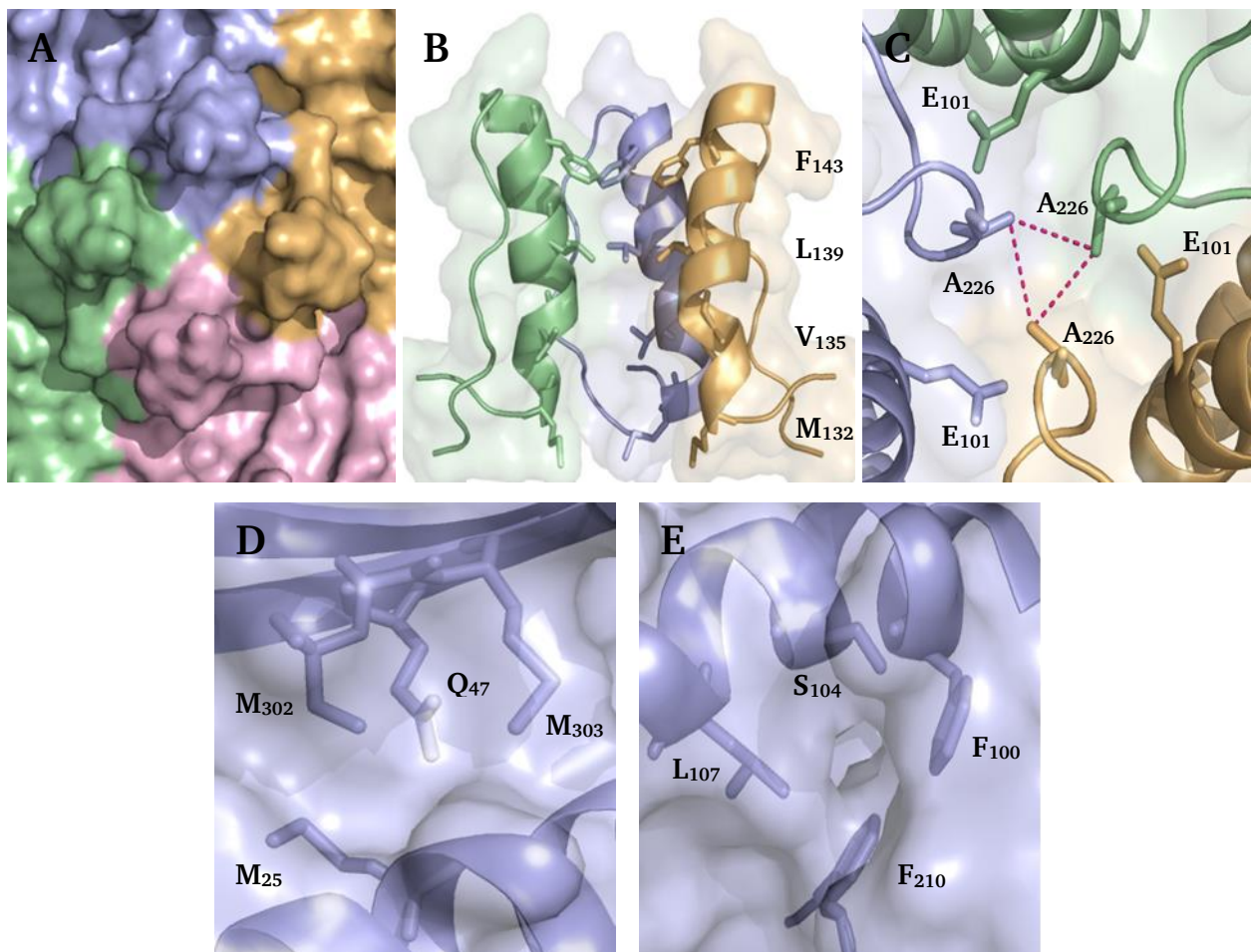
## 7. Die Kristallstruktur der *HnSOR*

---

### 7.1. Einleitung

Die SOR des mesophilen  $\gamma$ -Proteobakteriums *Halothiobacillus neapolitanus* war bereits zuvor biochemisch charakterisiert worden (Veith, 2011a). Die *HnSOR* stimmt in ihrer Aminosäuresequenz zu 40 % mit der *AaSOR* überein. Der ermittelte Aktivitätsbereich der *HnSOR* erstreckt sich von 10 - 99 °C. Enzymaktivität wurde über einen Bereich von pH 5,4 - 11 mit einem Optimum bei pH 8,4 beobachtet. Obwohl der mesophile Organismus eine Wachstumstemperatur von 30 °C präferiert, wurde die maximale Aktivität der *HnSOR* bei 80 °C nachgewiesen (42 U/mg), was dem Bereich des Temperaturoptimums der *AaSOR* entspricht. CD-Spektroskopie und *dynamic light scattering* ergaben, dass beide Enzyme eine sehr ähnliche Sekundär- und Quartärstruktur aufweisen (Veith, 2011a; 2011b). Bei reversibler thermischer Denaturierung der *HnSOR* mit kontinuierlichem Temperaturanstieg zeigten sich erste Effekte zwischen 50 und 60 °C und der Schmelzpunkt lag 20 K unter dem der *AaSOR* (Veith, 2012). Eine erste Kristallstruktur der *HnSOR* mit einer Auflösung von 2,9 Å bestätigte die sehr ähnliche Proteinarchitektur zur *AaSOR* aus 24 identischen Untereinheiten. Wie auch bei der *AaSOR* bildet ein zentrales  $\beta$ -barrel die Basis jeder Untereinheit, das von  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Lediglich die *coil*- und *loop*-Regionen wiesen geringfügige strukturelle Unterschiede auf. Unter optimalen Reaktionsbedingungen lag die maximale spezifische Aktivität der *HnSOR* beim nahezu Vierfachen der *AaSOR*. Analysen der vorläufigen Kristallstruktur hatten ergeben, dass die an der Ausbildung der Porenöffnungen beteiligten Reste eine höhere Flexibilität aufweisen als die entsprechenden Aminosäuren in der *AaSOR*. Diese erhöhte Flexibilität könnte eine Erweiterung der Porengröße bewirken und so für die gesteigerte Aktivität gegenüber der *AaSOR* verantwortlich sein (Veith, 2011a; 2012). Wie bei der *AaSOR* befinden sich bei der *HnSOR* schornsteinähnliche Strukturen an den Vierfachsymmetrieachsen, die aus vier Untereinheiten gebildet werden und als Zugang zur inneren zentralen Kavität fungieren (Abb. 47 A). Die inneren Oberflächen dieser Kanäle sind ebenfalls mit hydrophoben Resten (M<sub>132</sub>, V<sub>135</sub>, L<sub>139</sub> und F<sub>143</sub>) ausgekleidet (Abb. 47 B). Auch die an den Dreifachsymmetrieachsen lokalisierten Öffnungen sind in der *HnSOR* konserviert, jedoch werden sie vorwiegend aus Alanin- und Glutamat-Seitenketten (E<sub>101</sub>, A<sub>226</sub>) gebildet (Abb. 47 C). Mit Porengrößen von 4,9 Å und 3,9 Å (C-C-Abstände) der Tetra- und Trimerkanäle weisen beide Öffnungen eine ähnliche Größe wie bei der *AaSOR* auf (5,0 Å und 4,0 Å). Analog zur *AaSOR* scheinen hydrophobe Reste eine Eingangspore (M<sub>25</sub>, M<sub>302</sub>, M<sub>303</sub>) vom inneren Hohlraum zum aktiven Zentrum zu bilden (Abb. 47 D). Durch eine direkt dahintergelegene Glutamin-Seitenkette (Q<sub>47</sub>) erscheint diese Pore jedoch geschlossen. In der Nähe des Trimerkanals befindet sich eine weitere Verbindung zwischen dem inneren Hohlraum und dem aktiven Zentrum, der von zwei

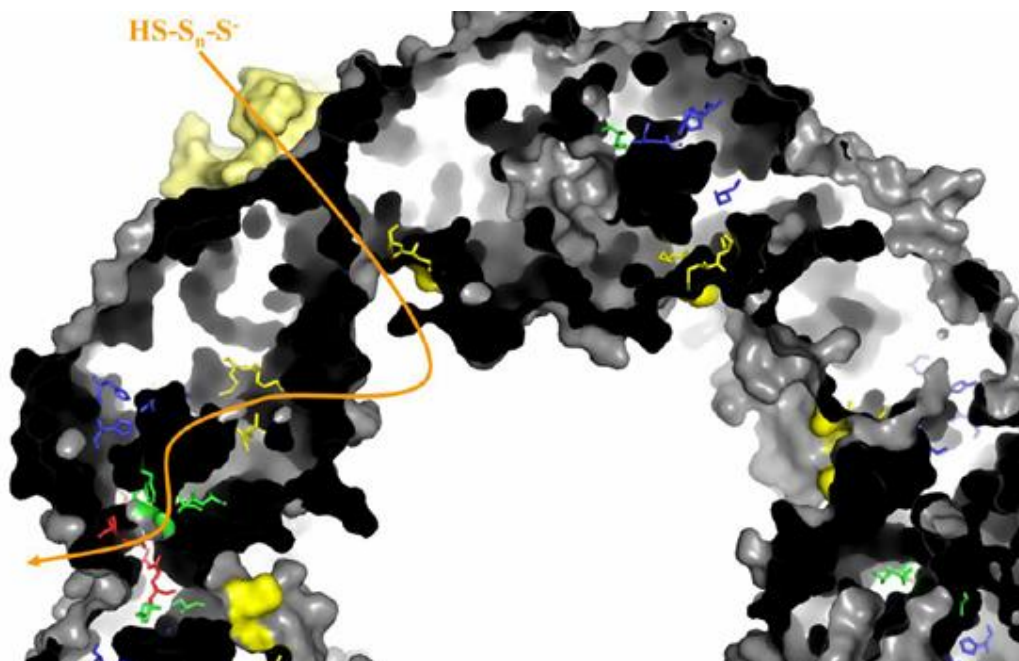
Phenylalanin-Seitenketten (F<sub>100</sub>, F<sub>210</sub>), einem Leucin (L<sub>107</sub>) und einem Serin (S<sub>104</sub>) gebildet wird (Abb. 47 E). Diese Ausgangspore des aktiven Zentrums wurde bereits bei der AtSOR beschrieben, ist jedoch in der Kristallstruktur des AaSOR-Holoenzym nicht nachweisbar (Li *et al.*, 2008; Veith, 2011a). Die räumliche Nähe dieser zweiten Öffnung des aktiven Zentrums zum Trimerkanal suggeriert einen potentiellen Ausgang für die Produkte der SOR-Reaktion, die vermutlich weiterführend das Enzym über diesen Trimerkanal verlassen (Veith, 2011a).



**Abbildung 47:** Kanäle und Porenöffnungen der *HnSOR* nach der vorläufigen Strukturanalyse durch A. Veith (2011). (A) Aufsicht des Tetramerkanals an der Vierfachsymmetrieachse des Holoenzym. (B) Seitliche Ansicht des Tetramerkanals mit drei sichtbaren Untereinheiten. Dargestellt sind der außen gelegene Phenylalaninring (F<sub>143</sub>), der mittlere Leucinring (L<sub>139</sub>), der innere Valinring (V<sub>135</sub>) und der Methioninring (M<sub>132</sub>) an der Basis. (C) Trimerkanal mit den Seitenketten von A<sub>226</sub> und E<sub>101</sub>. Die lila gestrichelten Linien markieren den Abstand der Alanin-Reste, die die Porenöffnung limitieren. (D) Eingangspore zum aktiven Zentrum aus M<sub>25</sub>, M<sub>302</sub> und M<sub>303</sub>. Durch Q<sub>47</sub> direkt hinter der Pore erscheint diese als geschlossen. (E) Ausgangspore aus dem aktiven Zentrum, die von F<sub>100</sub>, S<sub>104</sub>, L<sub>107</sub> und F<sub>210</sub> gebildet wird.

Basierend auf diesen untereinander vergleichbaren Beobachtungen bei *HnSOR* und *AtSOR* wurde eine allgemeingültige Route für Substrate und Produkte in der SOR postuliert (Abb. 48). Demnach gelangen lineare Schwefelspezies durch die Tetramerkanäle in die innere Kavität der SOR und durch die Eingangspore weiter ins aktive Zentrum der Untereinheit. Nach der Katalyse gelangen

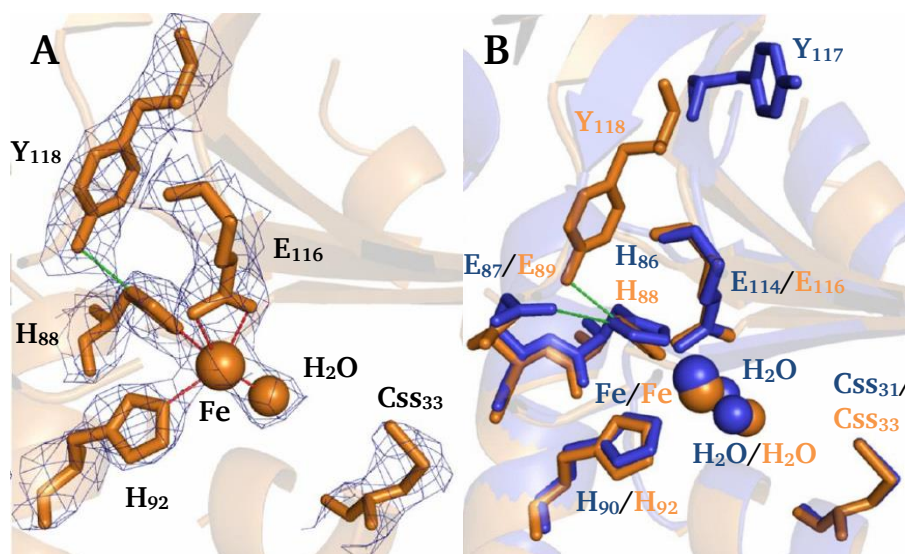
die Produkte über die Ausgangspore aus dem aktiven Zentrum und verlassen über einen Trimerkanal das Enzym (Veith, 2011a).



**Abbildung 48:** Querschnitt durch das *HnSOR*-Holoenzym mit den postulierten Substrat- und Produktwegen (orangener Pfeil; aus Veith, 2011a). Durch den Tetramerkanal (schwach gelb) gelangt das Substrat in die zentrale innere Kavität der SOR und von dort weiter durch die von M<sub>25</sub>, M<sub>302</sub> und M<sub>303</sub> gebildete Eingangspore (gelbe *sticks*) in das aktive Zentrum. Die Eisenliganden im aktiven Zentrum H<sub>88</sub>, H<sub>92</sub> und E<sub>116</sub> sind blau dargestellt. F<sub>100</sub>, S<sub>104</sub>, L<sub>107</sub> und F<sub>210</sub> bilden die Ausgangspore (grüne *sticks*), durch die die Reaktionsprodukte aus dem aktiven Zentrum gelangen und über den nahegelegenen von A<sub>226</sub> und E<sub>101</sub> gebildeten Trimerkanal (rote *sticks*) das Enzym verlassen.

Wie bei der Grundarchitektur weist auch das aktive Zentrum der *HnSOR* viele Gemeinsamkeiten mit der *AaSOR* auf (Abb. 49). So umfasst es ebenfalls ein mononukleäres Eisenzentrum, das von zwei Histidinen (H<sub>88</sub>, H<sub>92</sub>) und einem Glutamat (E<sub>116</sub>) koordiniert wird. Dabei wurden etwas größere Abstände zwischen den einzelnen Liganden und dem koordinierten Eisenatom ermittelt, als es in der *AaSOR* der Fall ist. In der primären Koordinationssphäre wurde ein einzelnes anstelle von zwei Wassermolekülen nachgewiesen, und dieses auch in lediglich 7 von 24 kristallographisch unabhängigen Monomeren. Somit lag das Eisen, wie bereits bei der *AtSOR* beobachtet, fünf-fach koordiniert vor (Li *et al.*, 2008). Darüber hinaus enthält das aktive Zentrum drei in allen bekannten SOR-Sequenzen konservierte Cysteine (C<sub>33</sub>, C<sub>103</sub>, C<sub>106</sub>). Analog zur *AaSOR* wurde bei C<sub>33</sub> eine zusätzliche Elektronendichte nachgewiesen, was auf eine Persulfurierung des Cysteins hindeutet. Unterschiede zur *AaSOR* sind vor allem in der sekundären Koordinationssphäre vorzufinden. Wird diese in der *AaSOR* von einem Glutamat (E<sub>87</sub>) gebildet, besteht sie in der *HnSOR* aus einem Tyrosin (Y<sub>118</sub>). Das zu E<sub>87</sub> homologe E<sub>89</sub> in der *HnSOR* kann aufgrund der größeren Entfernung zu H<sub>88</sub> keine Wasserstoffbrücke mit dem Eisenliganden H<sub>88</sub> ausbilden, wie es in der *AaSOR* für bzw. H<sub>86</sub> der Fall ist (Abb. 49 B).





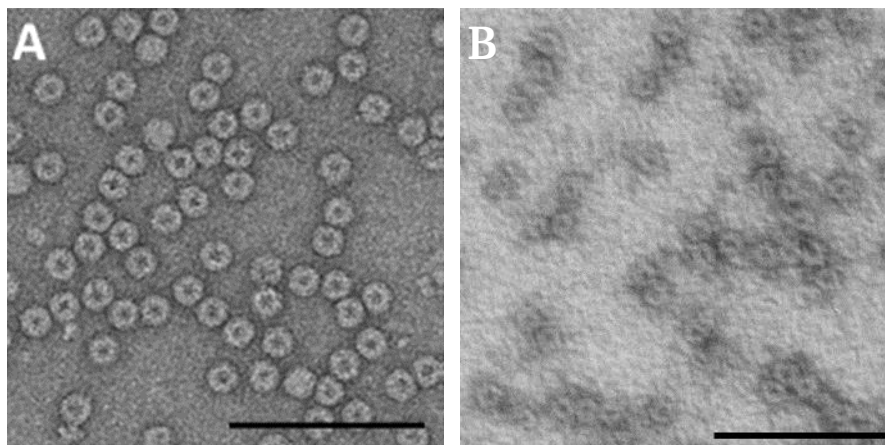
**Abbildung 49:** (A) Stick-Modell des aktiven Zentrums der *HnSOR* in 2,9 Å Auflösung (nach Veith, 2011a). Die 2  $F_o - F_c$  Elektronendichtekarte ist als blaues Netz mit einem Konturierungslevel von 1,0  $\sigma$  dargestellt. Eisenzentrum und Wasserligand sind als Kugeln abgebildet. Die rot gestrichelten Linien repräsentieren die Eisenkoordination und die grün gestrichelte Linie die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Y118 und H88. (B) Überlagerung der aktiven Zentren von *HnSOR* (gelb) und *AaSOR* (blau). Eisenzentren und Wasserliganden sind als Kugeln dargestellt. Grün gestrichelte Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Y118 und H88 (*HnSOR*) sowie zwischen E87 und H86 (*AaSOR*) an (Veith, 2011a).

Die Kristallisation der *HnSOR* und weiterführende Röntgenstrukturanalysen wurden in dieser Arbeit wiederholt, um eine neue 3D-Struktur mit höherer Auflösung zu erstellen und so einen detaillierteren Einblick in das Enzym zu erhalten. Durch die verbesserte Auflösung sollte unter anderem die Frage beantwortet werden, ob tatsächlich nur ein Wassermolekül an der primären Koordinationssphäre des Eisenatoms beteiligt ist oder das zweite Wassermolekül lediglich in der vorläufigen Kristallstruktur durch die geringe Auflösung nicht erkennbar war. Auch ermöglicht eine höhere Auflösung die detaillierte Untersuchung der aktiven Tasche der *HnSOR* auf die Existenz eines potentiellen Wasserstoffbrückennetzwerkes, wie es bereits für die *AaSOR* postuliert wurde (siehe 2.5.3). Ein weiteres Ziel war es, die postulierten Substrat- und Produktwege im Enzym genauer zu untersuchen. Hierzu wurden erstmals mit Hilfe von MOLE, CAVER Analyst und CAVER, Programme zur Analyse und Visualisierung von Poren und Kanälen in Proteinen, umfassende Porenanalysen an einer *SOR* durchgeführt. Die Untersuchungen umfassten die Vermessung und Charakterisierung bereits postulierter Poren und Kanäle sowie die Suche nach neuen, bislang nicht erkannten Verbindungswegen. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die Lokalisierung von Q47 die zur *AaSOR* analoge Eingangspore der *HnSOR* verschließt oder lediglich in ihrer Größe limitiert. Eine gesteigerte Auflösung ist bei diesem Vorhaben von großem Nutzen, da so die Existenz variabler Konformationen von Aminosäureseitenketten besser erkannt werden kann. Dies ermöglicht die Identifikation konformationsabhängiger Porenöffnungen.

## 7.2. Ergebnisse

### 7.2.1. Kristallisation und Röntgenkristallographie

Die Produktion der *HnSOR*-Wt erfolgte heterolog in *E. coli* BL 21 mit anschließender Isolation via *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie. Für elektronenmikroskopische Aufnahmen, hergestellt von Andreas Klingl (Biozentrum LMU München), wurde die isolierte *HnSOR*-Wt gegen 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 dialysiert und auf eine Proteinkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingestellt. Der Vergleich der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der rekombinanten *HnSOR* mit der nativen *AaSOR* zeigt, dass beide Enzyme globuläre Partikel mit etwa 15 nm Durchmesser bilden, die einen stark kontrastierten zentralen Bereich aufweisen (Abb. 50). Letzterer stammt vermutlich von eingedrunenem Kontrastmittel im inneren Hohlraum.

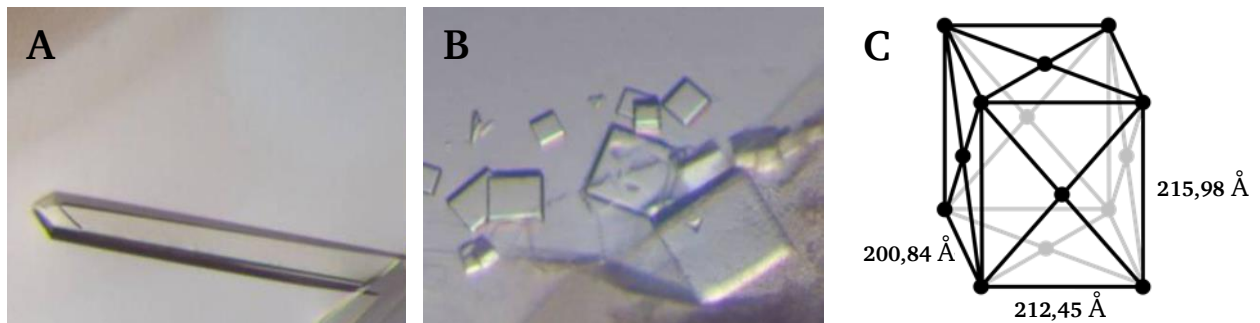


**Abbildung 50:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von zwei SOR-Präparationen mit Uranylacetat-Negativkontrastierung. (A) Native *AaSOR*-Wt (Kletzin, 1989). (B) Rekombinante *HnSOR*-Wt (A. Klingl; Biozentrum LMU München); die Größenbalken entsprechen 100 nm.

Für die in dieser Arbeit erneut vorgenommene Kristallisierung wurde die rekombinante Wildtyp-*HnSOR* gegen 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 dialysiert und auf eine Proteinkonzentration von 13,1 mg/mL eingestellt. Der Eisengehalt der *HnSOR*-Präparation betrug 1,40 Eisenatome/Untereinheit. Die Kristallisation des Enzyms wurde von Carlos Frazão (ITQB, Oeiras, Portugal) durchgeführt. Ein automatisiertes *Screening* bei 22 °C, basierend auf der *sitting-drop* Dampfdiffusion, diente der Auswahl geeigneter Kristallisationsbedingungen, die weiterführend optimiert wurden. Eine Kristallbildung wurde nach 24 h bei zwölf unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen beobachtet. Die besten Resultate erzielten dabei ein 0,1 M N-(2-Acetamido)iminodiessigsäure (ADA-) Puffer pH 6,5 mit 1 M Ammoniumsulfat, der zur Bildung von kleinen nadelförmigen und kubischen Kristallen führte (Abb. 51 A+B). Die Kristallinität der kubischen Kristalle ging jedoch mit der Zeit verloren, weshalb nur die nadelförmigen Kristalle durch geringfügige Variationen des pH-Wertes im Bereich von 6,4 - 7,0



und der Ammoniumsulfat-Konzentration zwischen 0,8 und 1,0 M optimiert wurden. Vielversprechende Kristalle wurden in eine kryoprotektive Lösung (0,1 M ADA pH 6,4; 1,3 M Ammoniumsulfat und 25 % [v/v] Glycerin) transferiert und bis zur Synchrotron-Bestrahlung gefroren in flüssigem Stickstoff gelagert.



**Abbildung 51:** Die *HnSOR*-Wt kristallisiert in 0,1 M ADA pH 6,5 mit 1 M Ammoniumsulfat als nadelförmige (A) und kubisch geformte Kristalle (B) (aus Veith, 2011a). (C) Orthorhombische, flächenzentrierte Elementarzelle der *HnSOR* und den zugehörigen Gitterpunkten.

Die Daten der Röntgendiffraktion wurden von Carlos Frazão (ITQB, Oeiras, Portugal) an der Strahlenquelle ID-29 des ESRF (Grenoble, Frankreich) mit einer Wellenlänge von 0,96112 Å gesammelt. Die *HnSOR* kristallisierte in der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  (Nummer 19 in *International Tables for Crystallography*) mit den Elementarzellendimensionen  $a = 200,84 \text{ Å}$ ,  $b = 212,45 \text{ Å}$  und  $c = 215,98 \text{ Å}$ . Das orthorhombische Kristallsystem mit flächenzentrierter Anordnung enthält effektiv vier Gitterpunkte je Einheitszelle, die auf die acht Eckpunkte und die sechs Flächenmittelpunkte verteilt sind (Abb. 51 C). Eine Elementarzelle beinhaltet damit sechs Hälften des Holoenzym an den Seitenflächen und acht 1/8-Teile an den Eckpunkten. Der in der Elementarzelle enthaltene Proteinanteil entspricht somit in der Gesamtheit vier *HnSOR*-Holoenzymen, wohingegen die tetragonale Raumgruppe  $I4$  der *AaSOR* zwei Holoenzyme umfasst. Die auflösungsabhängige Wahrscheinlichkeitsverteilung (Kantardjieff und Rupp, 2003) des Matthews-Koeffizienten (Matthews, 1968) zeigte eine relativ flache Verteilung mit einem Maximum (mit lediglich 8 % Wahrscheinlichkeit), das einer asymmetrischen Einheit mit 29 Monomeren und einem Lösungsmittelanteil von 47 % entspricht. 24 Monomere wie bei der *AaSOR* (mit 7 % Wahrscheinlichkeit) entsprechen einem Lösungsmittelanteil von 55 % und einem Matthews-Koeffizienten  $D_m$  von  $2,71 \text{ Å}^3/\text{Da}$ .

Aufgrund einer Sequenzidentität von 40 % wurde die *AaSOR* als Suchmodell für das *molecular replacement* gewählt. Es wurde bereits gezeigt, dass Homodimere die Ausgangsbasis für die Assemblierung des icosatetrameren *SOR*-Holoenzym darstellen (Urich *et al.*, 2004, 2006). Das *molecular replacement* wurde mit dem *AaSOR*-Dimer anstelle des Monomers als Modell durchgeführt. Dadurch reduzierte sich die Anzahl der in der asymmetrischen Einheit zu

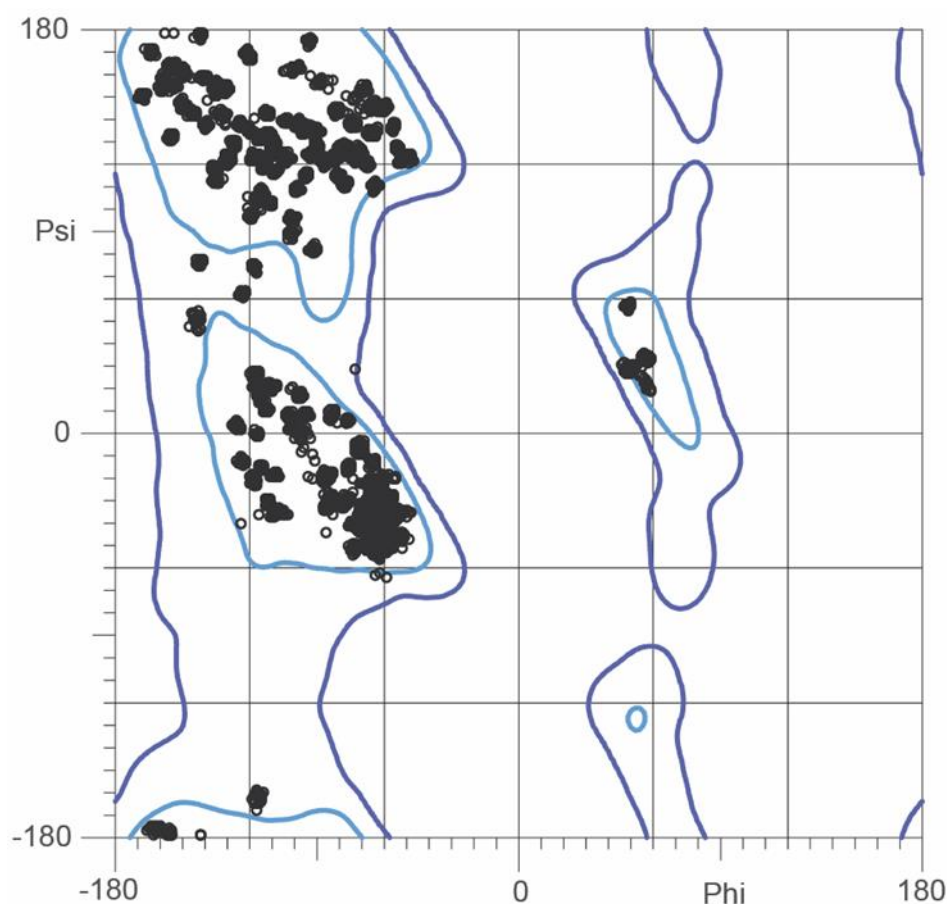
lokalisierenden Suchfragmente von 24 auf 12. Das Phasenproblem wurde mit *PHENIX* (Adams *et al.*, 2010; Afonine *et al.*, 2012) durch die Nutzung von *PHASER* (McCoy *et al.*, 2007) gelöst. Die Quartärstruktur der *HnSOR*-Wt zeigte eine 432 Punktgruppensymmetrie. Diese Anordnung wurde bereits in früheren *SOR*-Strukturen erhalten (Urich *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Veith, 2011a), was die Strukturlösung bekräftigt. Die wichtigsten Diffraktionsdaten, kristallographischen Parameter und Statistiken zum *Refinement* der neuen *HnSOR*-Kristallstruktur sind in Tabelle 20 aufgelistet und beziehen sich auf das 24 Untereinheiten umfassende Holoenzym. Mit 2,1 Å konnte die Auflösung im Vergleich zur bestehenden *HnSOR*-Kristallstruktur (2,9 Å) um 0,8 Å verbessert werden.

**Tabelle 20:** Kristallographische Parameter und gesammelte Diffraktionsdaten der *HnSOR*-Wt. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

Parameter	<i>HnSOR</i> -Wt
Quelle der Röntgenstrahlung	ESRF ID29
Wellenlänge (Å)	0,96112
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parameter Elementarzelle (Å)	a = 200,84 b = 212,45 c = 215,98
Auflösung (Å)	75,73 - 2,10 (2,17 - 2,10)
Anzahl einzelner Intensitäten	532671
Redundanz	13,5 (11,7)
I/σ (I)	14,8 (1,29)
<sup>a</sup> R <sub>meas</sub>	15,9 (214,6)
<sup>b</sup> R <sub>pim</sub> (%)	3,7 (25,5)
<sup>c</sup> R <sub>sym</sub> (%)	15,3 (215,1)
Vollständigkeit (%)	100,00 (100,00)
Untereinheiten pro asym. Einheit	24
Wilson B (Å <sup>2</sup> )	44
Struktur nach <i>Refinement</i>	7440 Aminosäuren
	4016 Wassermoleküle
	24 Eisenatome
	48 Sulfatmoleküle
R <sub>work</sub> (%)	16,40
R <sub>free</sub> (%)	20,57
Average ADP (Å <sup>2</sup> )	44
Bonds RMSD (Å)	0,020
Angles RMSD (°)	1,176

### 7.2.2. Allgemeine Strukturanalyse

Nach dem *Refinement* und der Optimierung der Struktur mittels *WinCoot* wurde die stereochemische Qualität der finalen *HnSOR*-Kristallstruktur anhand der Verteilung der Konformationen von  $\psi$ - und  $\phi$ -Torsionswinkeln des Protein-*backbones* in einem Ramachandran *Plot* überprüft (Ramachandran *et al.*, 1963). Die Analyse ergab, dass 97,6 % der Aminosäuren eine energetisch favorisierte Konformation und 2,4 % der Aminosäuren eine energetisch zulässige Konformation der  $\psi$ - und  $\phi$ -Torsionswinkel aufweisen (Abb. 52). Es wurden keine Ausreißer identifiziert.



**Abbildung 52:** Ramachandran *Plot* des *HnSOR*-Holoenzym (erstellt mit *MolProbity*). Dargestellt sind die  $\psi$ - und  $\phi$ -Torsionswinkel aller Aminosäuren des Holoenzym und deren Einteilung in favorisierte (hellblaue Umrandung) und erlaubte Konformationen (dunkelblaue Umrandung).

Der Anteil an Sekundärstrukturelementen wurde mit der PROMOTIF-Software (Hutchinson & Thornton, 1996) des SWISS-MODEL-Servers (Arnold *et al.*, 2006) quantifiziert (Tab. 21). Die Analyse ergab eine Vorhersage von 26,7 %  $\alpha$ -Helices und 31,6 %  $\beta$ -Faltblätter. Eine Analyse der früheren *HnSOR*-Struktur mit 2,9 Å Auflösung ergab einen Anteil von 27,5 %  $\alpha$ -Helices und 31,4 %  $\beta$ -Faltblätter (Veith, 2011a). Die aktuelle Struktur mit 2,1 Å Auflösung weist somit keine deutlichen Unterschiede auf.

**Tabelle 21:** Quantitative Analysen der Zusammensetzung an Sekundärstrukturelementen in der 3D-Struktur der *HnSOR* mittels PROMOTIF-Software. Der ermittelte Anteil an  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern der aktuellen 3D-Struktur (2,1 Å) ist den zur früheren *HnSOR*-Struktur (2,9 Å) gehörenden Daten gegenübergestellt (Veith, 2011a).

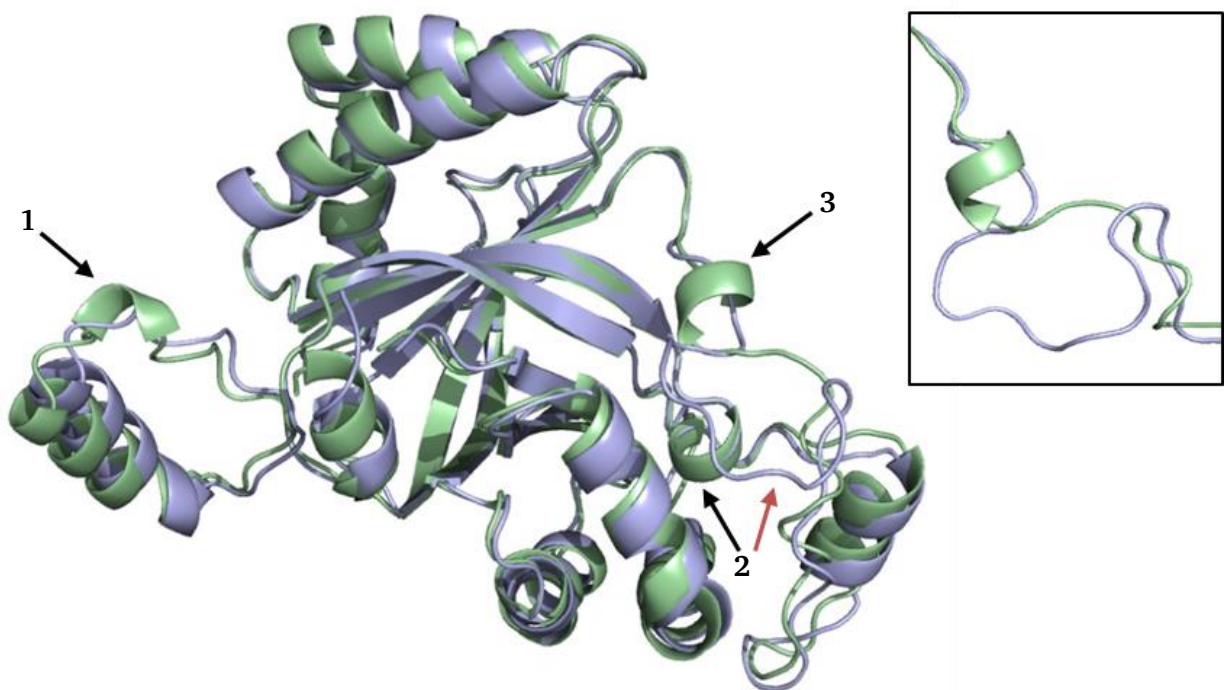
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt
3D-Struktur 2,9 Å (PROMOTIF)	27,5 %	31,4 %
3D-Struktur 2,1 Å (PROMOTIF)	26,7 %	31,6 %

Wie bereits in der früheren Kristallstruktur (Veith, 2011a) fehlen auch in der neuen Struktur die ersten drei Aminosäuren am N-Terminus und die letzte Aminosäure am C-Terminus des Enzyms. Vergleichbares wurde bereits in der Struktur der *AaSOR* beobachtet. Bedingt durch posttranslationale Modifikation fehlt dort das N-terminale Methionin. Die letzte C-terminale Aminosäure der *AaSOR* fehlt aufgrund der hohen strukturellen Flexibilität dieser Region an der Oberfläche des Proteins (Urich, 2005c). Auch bei der *HnSOR* liegen N- und C-Terminus der Untereinheiten an der Proteinoberfläche, weshalb das Fehlen der beschriebenen Aminosäure auf die hohe Flexibilität der beiden Regionen zurückzuführen ist. Die Überlagerung der  $\alpha$ -Kohlenstoffketten beider Kristallstrukturen von *AaSOR* (PDB id: 2cb2; Urich *et al.*, 2006) und *HnSOR* bestätigt die bereits beschriebene Ähnlichkeit der Proteinarchitekturen beider Enzyme (Abb. 53). Mit PDBeFold (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>; Krissinel und Henrick, 2004) wurde der RMSD (*Root Mean Square Deviation*)-Wert berechnet. Der RMSD-Wert beschreibt die Ähnlichkeit der Koordinaten beider  $\alpha$ -Kohlenstoffketten. Der niedrige RMSD-Wert von  $1,09 \pm 0,03$  Å bestätigt die ähnliche Grundarchitektur beider Enzyme. Mit Hilfe von STRIDE (Structural identification; Frishman, 1995) erfolgte eine Charakterisierung und Lokalisierung der Sekundärstrukturelemente in der Kristallstruktur der *HnSOR* (Tab. 22).

**Tabelle 22:** Übersicht der von STRIDE (Frishman, 1995) vorhergesagten  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices mit den zugehörigen Aminosäuren und der Länge des jeweiligen Sekundärstrukturelements.

	$\beta$ -Faltblatt	Länge (As)		$\alpha$ -Helix	Länge (As)
1	I <sub>7</sub> - I <sub>15</sub>	9	1	P <sub>19</sub> - A <sub>37</sub>	19
2	F <sub>42</sub> - I <sub>53</sub>	12	2	V <sub>85</sub> - N <sub>95</sub>	11
3	M <sub>74</sub> - W <sub>82</sub>	9	3	K <sub>97</sub> - M <sub>109</sub>	13
4	V <sub>110</sub> - D <sub>125</sub>	16	4	M <sub>132</sub> - K <sub>145</sub>	14
5	T <sub>159</sub> - V <sub>167</sub>	9	5	H <sub>171</sub> - N <sub>189</sub>	19
6	M <sub>193</sub> - V <sub>204</sub>	12	6	P <sub>214</sub> - V <sub>221</sub>	8
7	Q <sub>252</sub> - W <sub>259</sub>	8	7	P <sub>262</sub> - V <sub>274</sub>	13
8	L <sub>290</sub> - Q <sub>305</sub>	16	8	Y <sub>276</sub> - H <sub>289</sub>	14
			9	L <sub>307</sub> - H <sub>311</sub>	5

Wie auch bei der *AaSOR* bildet ein zentrales  $\beta$ -barrel, das von den acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern gebildet wird, die Basis einer jeden Untereinheit der *HnSOR*. Neun  $\alpha$ -Helices umgeben dieses  $\beta$ -barrel. Zwei dieser  $\alpha$ -Helices befinden sich oberhalb der Öffnung des  $\beta$ -barrels. Die übrigen  $\alpha$ -Helices sind auf entgegengesetzten Seiten des  $\beta$ -barrels lokalisiert. Geringfügige strukturelle Unterschiede zur *AaSOR* sind in den *coiled*- und *loop*-Regionen enthalten. So fehlen der *HnSOR* drei kurze helikale Regionen von je fünf Aminosäuren. An der Position, an der sich in der *AaSOR* die dritte helikale Region befindet, enthält die *HnSOR* eine kurze Insertion (Abb. 53). In diesem Bereich weicht das *backbone* der *HnSOR* um bis zu 8 Aminosäuren vom *backbone* der *AaSOR* ab. Im Holoenzym ist dieser inserierte Bereich an der äußeren Oberfläche des Enzyms gelegen.



**Abbildung 53:** Überlagerung der Monomere von *AaSOR* (grün) und *HnSOR* (blau). Die schwarzen Pfeile zeigen die drei helikalen Bereiche in der Kristallstruktur der *AaSOR* an, die nicht in der Struktur der *HnSOR* vorkommen. Der rote Pfeil zeigt eine kurze Insertion in der *HnSOR* gegenüber der *AaSOR*. Der schwarz umrandete Kasten hebt diesen Insertionsbereich hervor.

Salzbrücken innerhalb des Proteins stellen ein wichtiges Kriterium für die Thermostabilität von Enzymen dar (Karshikoff & Ladenstein, 2001). Um die Stabilität der *HnSOR* besser interpretieren und mit der *AaSOR* vergleichen zu können, wurden Aminosäuren mit unterschiedlich geladenen Seitenketten gesucht, deren Ionenpaare einen maximalen Abstand von 4 Å aufweisen (Wang *et al.*, 2003). Innerhalb der A-Untereinheit wurden neun solcher Salzbrücken gefunden (Tab. 23), wohingegen ein entsprechendes Monomer der *AaSOR* 15 interne Salzbrücken umfasst (Urich, 2005c). Das A-Monomer der *HnSOR* steht im direkten Kontakt mit fünf weiteren Untereinheiten (B, C, M, T, Z), wobei es über jeweils zwei Salzbrücken, die sich allesamt im Bereich



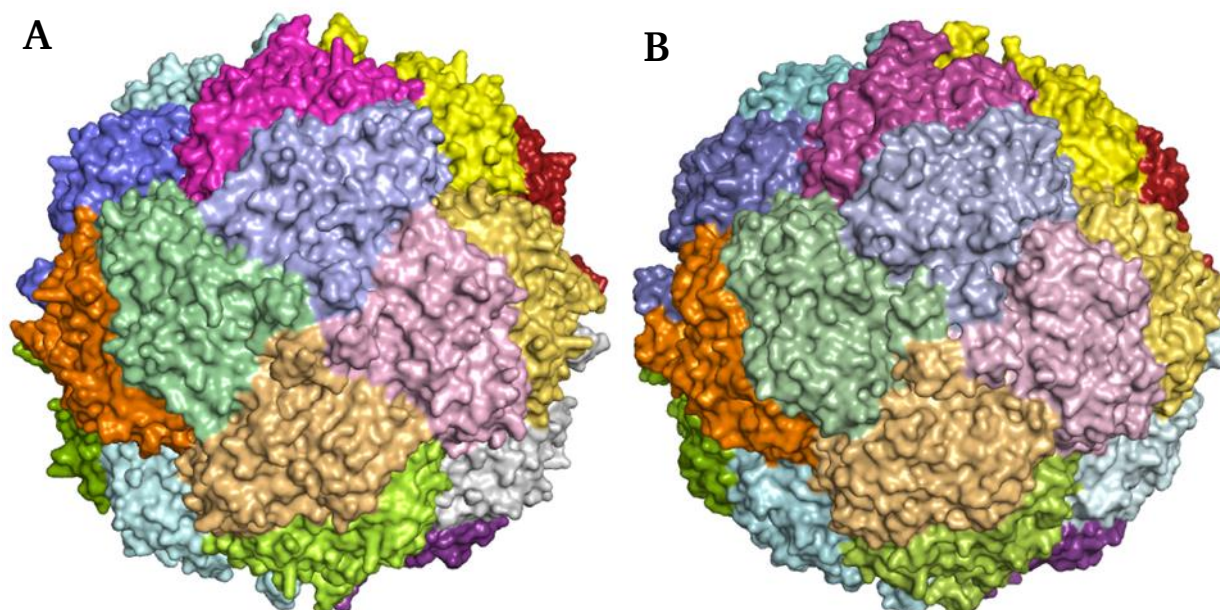
des Tetramerkans befinden, mit dem M- und Z-Monomer verbunden ist (Tab. 23). Zu den übrigen drei Untereinheiten besteht keine Ionenbindung. Ein Monomer der AaSOR hingegen ist mit den angrenzenden Untereinheiten über insgesamt sechs Salzbrücken verbunden, die in anderen Bereichen der Untereinheit lokalisiert sind (Urich, 2005c).

**Tabelle 23:** Übersicht der identifizierten Ionenpaare innerhalb des A-Monomers der *HnSOR* und zu den benachbarten Untereinheiten mit den zugehörigen Distanzen.

Ionenpaare innerhalb des Monomers		Ionenpaare zwischen Untereinheiten	
Aminosäuren	Distanz (Å)	Aminosäuren (Kette)	Distanz (Å)
D <sub>20</sub> – K <sub>18</sub>	3,85	D <sub>134</sub> (A) – K <sub>151</sub> (M)	2,80
E <sub>46</sub> – R <sub>309</sub>	3,63	D <sub>141</sub> (A) – R <sub>148</sub> (M)	2,61
D <sub>66</sub> – R <sub>68</sub>	2,88	R <sub>148</sub> (A) – D <sub>141</sub> (Z)	2,74
E <sub>90</sub> – H <sub>39</sub>	2,71	K <sub>151</sub> (A) – D <sub>134</sub> Z)	2,83
D <sub>125</sub> – K <sub>187</sub>	3,15		
E <sub>147</sub> – K <sub>145</sub>	3,96		
E <sub>184</sub> – K <sub>123</sub>	3,67		
E <sub>304</sub> – R <sub>158</sub>	2,82 + 2,87		
E <sub>258</sub> – R <sub>309</sub>	2,23 + 2,34		

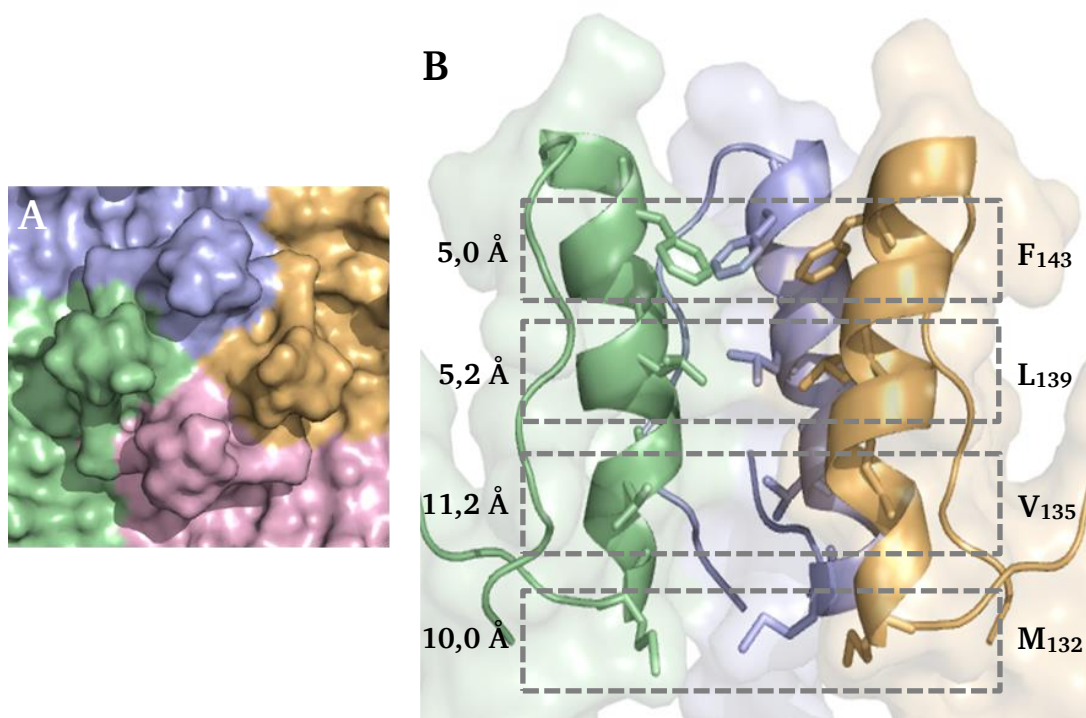
### 7.2.3. Poren und Kanäle in der *HnSOR*

Sowohl die AaSOR als auch die *HnSOR* haben einen sphärischen Aufbau und besitzen sechs schornsteinähnlichen Tetramerkankanäle an den Vierfachsymmetrieachsen des Enzyms (Abb. 54).



**Abbildung 54:** Kristallstrukturen der Holoenzyme von *HnSOR* (A) und *AaSOR* (B) mit Blick auf die nichtkristallographische Vierfachsymmetrieachse und Färbung der einzelnen Untereinheiten.

Diese Kanäle stellen vermutlich den Zugang für lineare Schwefelspezies wie z.B. Polysulfid zur inneren Kavität des Enzyms dar. Während in der Struktur der *AaSOR* optisch eine deutliche Eingangspore zu diesen Kanälen erkennbar ist, erscheinen sie bei der *HnSOR* als geschlossen. Die innere Oberfläche der von den Aminosäuren 132 - 154 gebildeten Tetramerkkanäle ist vorrangig mit hydrophoben Resten ausgekleidet. Zwei Ringe aus je vier Phenylalaninseitenketten bilden die engste Stelle der Pore am Tetramerkkanal in der *AaSOR*. Auch in der *HnSOR* war der äußere Phenylalaninring (F<sub>143</sub>) im oberen Bereich des Kanals als limitierend für den Porendurchmesser identifiziert worden (minimaler Seitenkettenabstand von 4,9 Å; Veith, 2011). Die Durchmesser des Leucin- und Valinrings betrugen 5,4 bzw. 11,3 Å. An der Position des Valinrings befindet sich in den Tetramerkkanälen der *AaSOR* ein zweiter Ring aus Phenylalaninseitenketten, die den Durchmesser des Kanals begrenzen (Urich *et al.*, 2006; Veith, 2011a). Durch die größeren Abstände innerhalb des Valinrings entfällt diese innere Begrenzung der Tetramerkkanäle bei der *HnSOR*. Für den Durchmesser des Methioninrings war 10 Å ermittelt<sup>1</sup> worden (Veith, 2011a). In der neuen, höher aufgelösten Kristallstruktur wurden nur geringfügige Unterschiede bezüglich der kalkulierten Distanzen zwischen den Seitenketten beobachtet (Abb. 55).



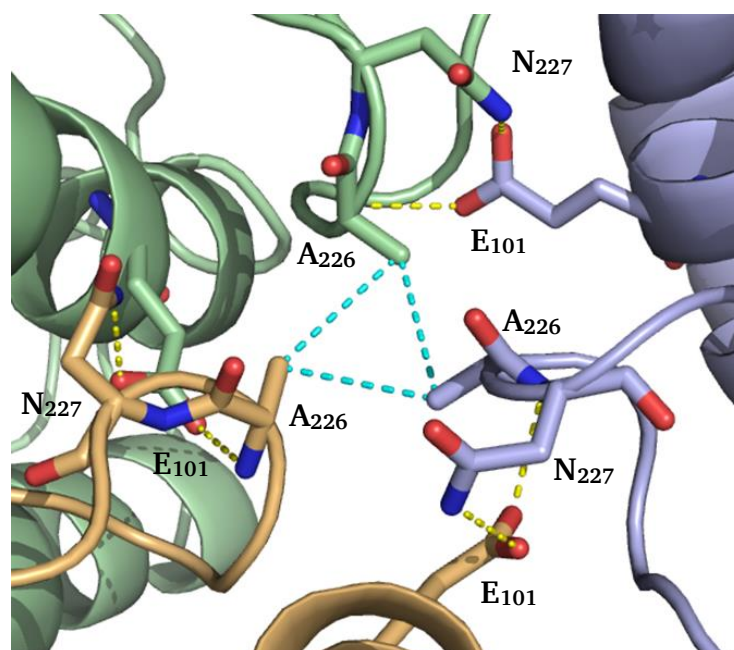
**Abbildung 55:** Tetramerkkanal der *HnSOR*. (A) Obere Ansicht des Tetramerkkanals an der Vierfachsymmetrieachse des Holoenzym. (B) Seitliche Ansicht des Tetramerkkanals mit drei sichtbaren Untereinheiten. Dargestellt sind der äußere Phenylalaninring (F<sub>143</sub>) der mittlere Leucinring (L<sub>139</sub>), der innere Valinring (V<sub>135</sub>) und der Methioninring (M<sub>132</sub>) an der Basis. Die angegebenen Distanzen beschreiben Seitenkettenabstände in den einzelnen Ringen. Dabei handelt es sich um Mittelwerte aus allen sechs Tetramerkkanälen.

<sup>1</sup> Der Porendurchmesser des Methioninrings wurde ursprünglich mit 20 Å angegeben (Veith, 2011a, S.107 Z. 12). Eine Überprüfung der damals verwendeten *HnSOR*-Kristallstruktur ergab jedoch einen Abstand der Seitenketten von 10 Å. Die Originalangabe wurde daher als Druckfehler interpretiert.



Hierzu wurden die Porendurchmesser aller sechs Tetramerkanaele berechnet und gemittelt. Auch in der neuen Struktur limitiert der obere Phenylalaninring den Porendurchmesser. Die minimale Distanz der Seitenketten ist mit 5,0 Å (min. 4,96 Å / max. 5,07 Å) um 0,1 Å größer als in der früheren Version der 3D-Struktur. Kein Unterschied bezüglich der Porengröße wurde für den Methioninring an der Basis des Tetramerkanales gefunden. Der Durchmesser beträgt 10,0 Å (min. 9,76 Å / max. 10,10 Å). Der darüber gelegene Valinring ist mit 11,2 Å (min. 11,17 Å / max. 11,27 Å) in der neuen Struktur um 0,1 Å kleiner. Der Durchmesser des mittleren Leucinrings beträgt 5,2 Å (min. 5,11 Å / max. 5,32 Å) und ist damit um 0,2 Å reduziert. Mit CAVER Analyst, einem Programm zur Analyse und Visualisierung von Poren und Kanälen in Proteinen, wurde der Porendurchmesser zwischen den einzelnen Ringen detaillierter bestimmt. Hierbei werden nicht wie zuvor die Distanzen zwischen einzelnen Atomen, sondern Hohlräume innerhalb des Proteins gesucht und deren Durchmesser ermittelt. Für F-, L-, V- und M-Ring ergaben sich maximale Durchmesser von 1,6 Å, 1,94 Å, 7,6 Å bzw. 6,67 Å. Bei der Verwendung von MOLE, einem weiteren Programm zur Lokalisierung und Charakterisierung von Kanälen, wurde der Tetramerkanal auch bei zahlreichen Variationen der Analyseparameter in keinem Fall von der Sonde passiert und nicht als Kanal erkannt.

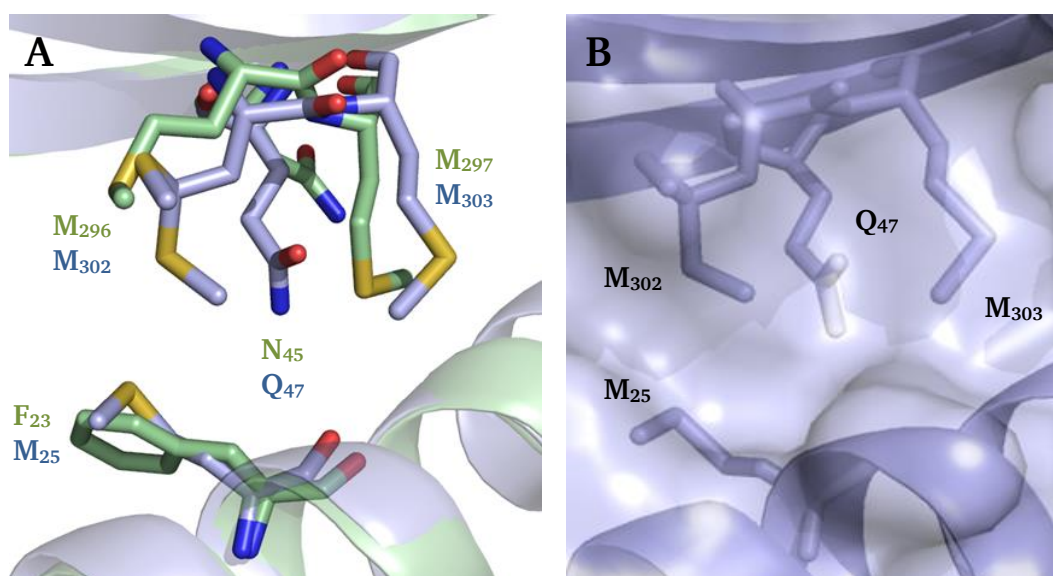
Die vermutlichen Ausgangsporen an den Dreifachsymmetrieachsen werden primär durch die Aminosäuren A<sub>226</sub> und E<sub>101</sub> gebildet. Der Abstand der terminalen C<sub>β</sub>-Atome der die Porengröße begrenzenden Alaninreste betrug in der ersten Version der *HnSOR*-Struktur 3,9 Å. Diese Beobachtung wurde in der neuen *HnSOR*-Struktur bestätigt (Abb. 56).



**Abbildung 56:** Trimerkanal der *HnSOR* mit den Seitenketten von E<sub>101</sub>, A<sub>226</sub> und N<sub>227</sub>. Die in Cyan gestrichelten Linien markieren den Abstand zwischen den Alanin-Resten, die die Porenöffnung limitieren. Die gelb gestrichelten Linien repräsentieren potentielle Wasserstoffbrücken zwischen E<sub>101</sub> und A<sub>226</sub> sowie zwischen E<sub>101</sub> und N<sub>227</sub>.

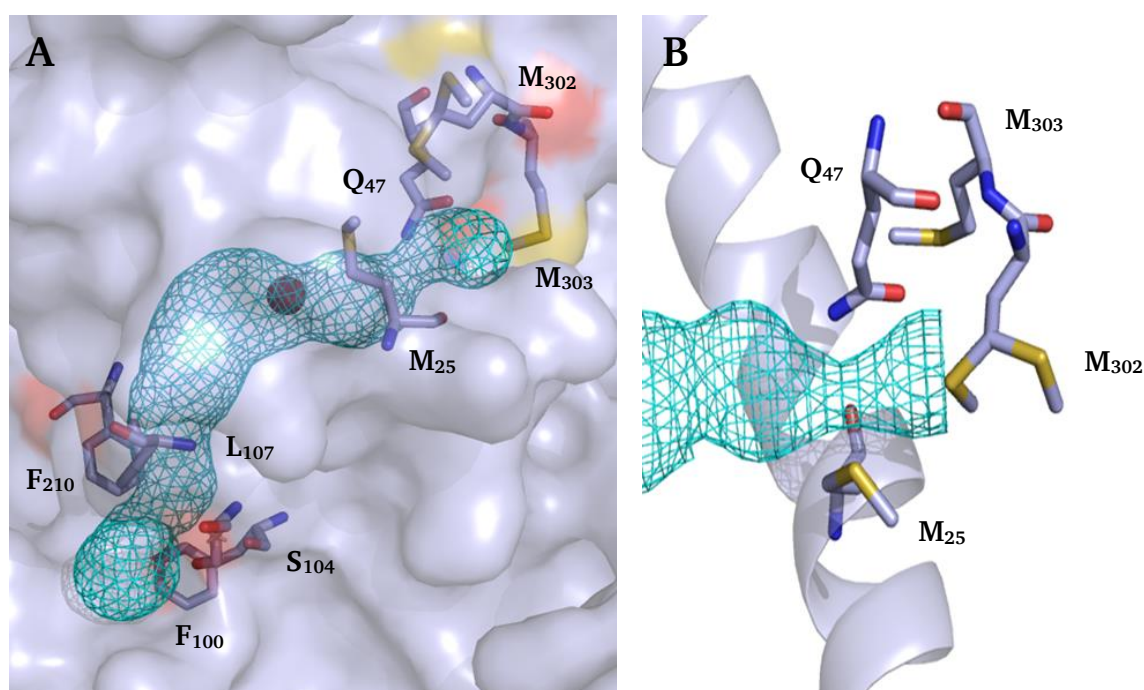
Auch hier betrug der gemittelte Abstand der Alaninreste aus allen acht Trimerkanälen 3,9 Å (min. 3,85 Å / max. 4,07 Å). Die beiden  $\epsilon$ -Sauerstoffatome der Carboxylgruppe von E<sub>101</sub> befinden sich in einer geeigneten Distanz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den nahegelegenen A<sub>226</sub> und N<sub>227</sub>. Der mittlere Abstand des  $\epsilon$ 1-Sauerstoffs von E<sub>101</sub> zum  $\delta$ 2-Stickstoffatom des Asparagins beträgt 2,9 Å (min. 2,73 Å / max. 3,13 Å), der des  $\epsilon$ 2-Sauerstoffs von E<sub>101</sub> zur  $\alpha$ -Aminogruppe von A<sub>226</sub> ebenfalls 2,9 Å (min. 2,76 Å / max. 3,07 Å). Dies deckt sich weitestgehend mit den früheren Messungen von 3,0 Å Abstand zwischen dem  $\epsilon$ 1-Sauerstoff von E<sub>101</sub> und dem  $\delta$ 2-Stickstoffatom des Asparagins und 2,9 Å vom  $\epsilon$ 2-Sauerstoff des E<sub>101</sub> zur  $\alpha$ -Aminogruppe von A<sub>226</sub>. Die Überprüfung des Trimerkanals mittels CAVAR Analyst ergab einen Porendurchmesser von 1,24 Å am engsten Punkt zwischen den Alanin-Seitenketten. Die Analyse mit MOLE ergab einen Durchmesser von 1,22 Å.

Bei der AaSOR wurde eine Verbindung zwischen aktivem Zentrum und dem inneren Hohlraum des Enzyms durch eine putative Eingangspore beobachtet, die aus den Aminosäuren F<sub>32</sub>, M<sub>296</sub> und M<sub>297</sub> gebildet wird (Veith, 2011a; Urich *et al.*, 2006). Eine solche Verbindung wurde für die HnSOR bislang nicht gefunden. In der ersten Kristallstruktur schien eine Glutamin-Seitenkette eine Porenöffnung an analoger Stelle zur AaSOR zu blockieren. Eine Überlagerung von AaSOR und der neuen HnSOR-Struktur zeigt, dass an den Positionen der porenbildenden Aminosäuren der AaSOR in der HnSOR die Aminosäuren M<sub>25</sub>, M<sub>302</sub> und M<sub>303</sub> lokalisiert sind (Abb. 57 A). Die Oberflächendarstellung dieser Region lässt jedoch keine Porenöffnung erkennen (Abb. 57 B). Der Bereich zwischen den Seitenketten der genannten Aminosäuren wird durch einen Glutaminrest (Q<sub>47</sub>) besetzt, was eine Verbindung mit der dahintergelegenen aktiven Tasche verhindert.



**Abbildung 57:** Potentielle Pore zum aktiven Zentrum in der neuen Kristallstruktur der HnSOR. (A) Überlagerung der Eingangspore der AaSOR (hellgrün) und der entsprechenden Region in der HnSOR mit den relevanten Aminosäuren als stick-Darstellung. (B) Mögliche Pore aus M<sub>25</sub>, M<sub>302</sub> und M<sub>303</sub>. Durch Q<sub>47</sub> direkt hinter der Pore erscheint diese als geschlossen.

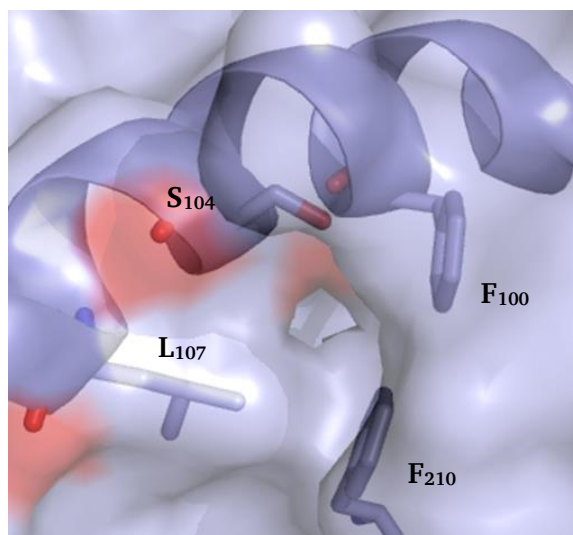
An der entsprechenden Stelle befindet sich in der AaSOR ein Asparagin (N<sub>45</sub>), das aufgrund seiner Orientierung nicht in die Porenöffnung hineinragt. In allen Untereinheiten der HnSOR wurden zwei mögliche Konformationen von M<sub>302</sub> in der Elektronendichtekarte beobachtet (siehe Abb. 57 A+B). Um zu überprüfen, ob eine Porenöffnung von einer der beiden M<sub>302</sub>-Konformation abhängt, wurde jeweils eine der beiden Konformationen in der 3D-Struktur des Holoenzym gelöscht und der Effekt in der Oberflächendarstellung geprüft. Eine Porenöffnung wurde mit keiner der beiden Konformationen beobachtet. Mit dem PyMOL *Plugin* CAVER wurde geprüft, ob eine Verbindung zwischen dem innerem Hohlraum der HnSOR und dem aktiven Zentrum an entsprechender Position dennoch möglich ist, obwohl visuell keine Porenöffnung erkennbar war (Abb. 58).



**Abbildung 58:** CAVER-Analyse der HnSOR zur Identifikation von Porenöffnungen zur aktiven Tasche. Die Analyse wurde mit 0,9 Å Sondenradius und S<sub>104</sub> als Startpunkt durchgeführt. (A) Oberflächendarstellung eines Ausschnitts des HnSOR-Holoenzym und eines identifizierten Kanals (Netzstruktur in Cyan). Die beiden Enden des Kanals stellen die Ein- und Austrittspunkte der Sonde in die aktive Tasche und somit die Poren dar. Die an der Porenbildung beteiligten Aminosäuren sind als *sticks* abgebildet, das Eisenatom im aktiven Zentrum als rote Kugel. (B) Vergrößerung des identifizierten Kanals an der putativen Eingangspore.

Als Startpunkt für die Analyse wurde S<sub>104</sub> gewählt, eine Aminosäure, die an der Bildung der bereits in der früheren Kristallstruktur beobachteten Ausgangspore beteiligt ist. Der Sondendurchmesser betrug 1,8 Å. Die Analyse ergab, dass tatsächlich ein Kanal mit der putativen Pore als Eintrittspunkt in das aktive Zentrum der HnSOR vorhanden ist, deren engster Punkt einen Durchmesser von 1,92 Å aufweist (Abb. 58). Der Durchmesser der Pore wird dabei primär durch Q<sub>47</sub> sowie M<sub>25</sub> und dem *backbone* der zugehörigen Helix limitiert (Abb. 58 B). Eine weitere Pore mit Zugang zum aktiven Zentrum war bereits in der ersten Kristallstruktur der HnSOR identifiziert und

charakterisiert worden (Veith, 2011b). Sie wird von den Seitenketten von F<sub>100</sub>, F<sub>210</sub>, L<sub>107</sub> und S<sub>104</sub> gebildet und war aufgrund ihrer räumlichen Nähe zum Trimerkanal als Ausgangspore der aktiven Tasche deklariert worden. Die Analyse der Pore mittels CAVAR Analyst ergab einen Porendurchmesser von 2,8 Å am engsten Punkt (Abb. 59). Eine analog hierzu durchgeführte Untersuchung des AaS<sub>OR</sub>-Holoenzym ergab, dass dort eine solche Verbindung nicht vorliegt.

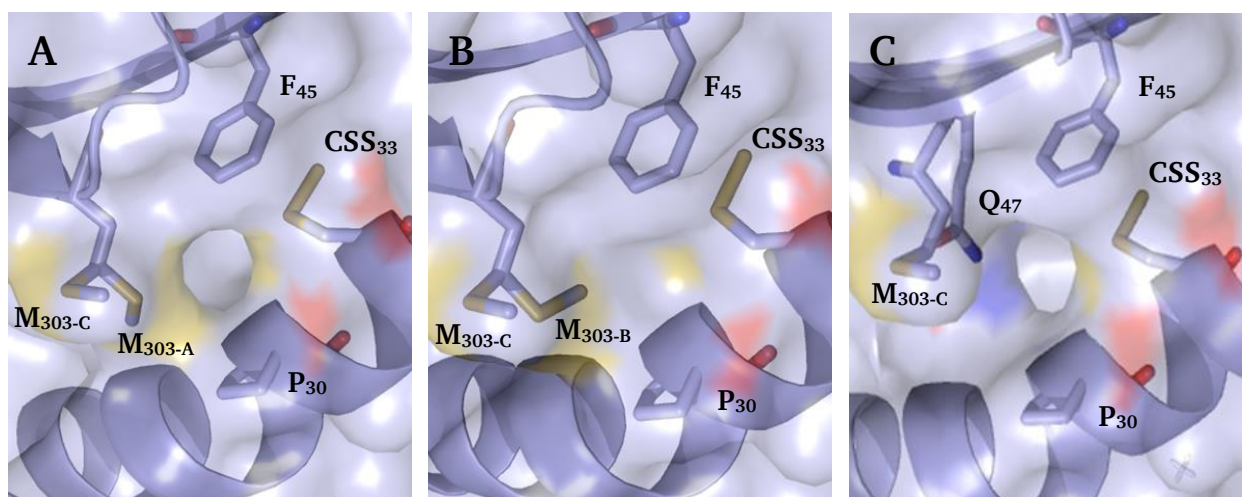


**Abbildung 59:** Ausgangspore aus dem aktiven Zentrum der neuen *HrsOR*-Kristallstruktur. Die Größe der Porenöffnung wird durch die Aminosäuren F<sub>100</sub>, F<sub>210</sub>, L<sub>107</sub> und S<sub>104</sub> begrenzt.

Nach gründlicher Analyse aller Untereinheiten des Holoenzym wurde noch eine weitere Pore gefunden, die aktives Zentrum und inneren Hohlraum verbindet. Diese war jedoch nur in der A-Kette der neuen Kristallstruktur zu erkennen. Die Pore wird von den Seitenketten der Aminosäuren P<sub>30</sub>, F<sub>45</sub> und M<sub>303</sub> gebildet und verläuft direkt vorbei am persulfurierten C<sub>33</sub> (Abb. 60 A). In keiner weiteren Untereinheit der *HnsOR* war dieser Zugang optisch erkennbar, auch wenn alle beteiligten Aminosäuren eine ähnliche Anordnung besitzen. Beim Vergleich aller beteiligten Seitenketten stellte sich heraus, dass M<sub>303</sub> im Wesentlichen in drei unterscheidbaren Konformationen existiert. Die beiden Konformere M<sub>303-A</sub> und M<sub>303-B</sub> unterscheiden sich in der Ausrichtung des terminalen ε-Kohlenstoffatoms. Bei M<sub>303-A</sub> entfernt sich dieses von der Porenöffnung, wohingegen es bei M<sub>303-B</sub> ins Poreninnere ragt. Bei Konformer M<sub>303-C</sub> entfernen sich das δ-Schwefel- und das ε-Kohlenstoffatom von der Porenöffnung. In der A-Kette liegen die beiden Konformere M<sub>303-A</sub> und M<sub>303-C</sub> vor und die Pore erscheint als geöffnet (Abb. 60 A). Die Ketten L, M, N und P umfassen die Konformere M<sub>303-B</sub> und M<sub>303-C</sub> und die Pore erscheint als geschlossen (Abb. 60 B). In den übrigen 19 Untereinheiten wurde ausschließlich das M<sub>303-B</sub>-Konformer in der Elektronendichtekarte gefunden. Die Pore erscheint ebenfalls als geschlossen. Wird in den Ketten L, M, N und P lediglich das M<sub>303-C</sub>-Konformer modelliert, ist eine Porenöffnung erkennbar (Abb. 60 C). Die Öffnung der Pore erfolgt somit mit den Konformeren M<sub>303-A</sub> und M<sub>303-C</sub>, wohingegen die



Pore im Falle des  $M_{303-B}$ -Konformers als geschlossen erscheint. Die abgebildeten Bereiche mit den unterschiedlichen  $M_{303}$ -Konformeren wurden zudem mittels CAVER Analyst analysiert und die Porengröße in Abhängigkeit der  $M_{303}$ -Konformationen quantifiziert. Für die Pore der A-Kette mit  $M_{303-A}$ -Konformation ergab sich ein minimaler Porendurchmesser von 2,9 Å. Der die Porengröße limitierende Abstand zwischen dem  $\gamma$ -Schwefelatom von  $CSS_{33}$  und dem  $\delta$ -Schwefelatom von  $M_{303}$  beträgt 6,15 Å. Für die B-Konformation wurde keine Pore nachgewiesen. Erst bei Reduktion des Sondenradius auf 0,7 Å wurde der Raum zwischen den porenbildenden Seitenketten passiert. Am engsten Punkt beträgt der Durchmesser lediglich 1,6 Å. Der Abstand zwischen dem  $\gamma$ -Schwefelatom von  $CSS_{33}$  und dem terminalen  $\epsilon$ -Kohlenstoffatom von  $M_{303}$  beträgt 4,27 Å und limitiert die Porengröße in dieser Konformation. Für die C-Konformation von  $M_{303}$  wurde ein minimaler Porendurchmesser von 3,1 Å ermittelt. Die Porengröße wird in diesem Fall durch einen Abstand von 6,3 Å zwischen dem  $\gamma$ -Schwefelatom von  $CSS_{33}$  und dem  $\epsilon$ -Stickstoffatom von  $Q_{47}$  begrenzt (Abb. 60 C).



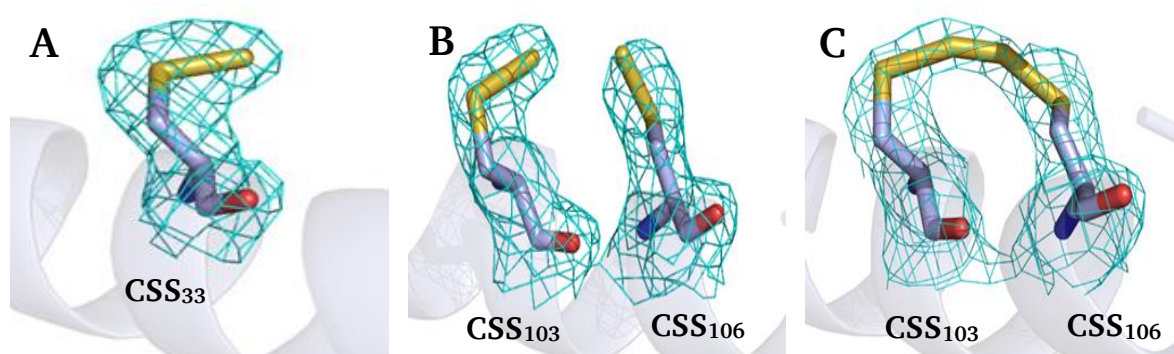
**Abbildung 60:** Neu identifizierte Zugangspore zum aktiven Zentrum der *HnSOR*. (A) Oberflächendarstellung der Zugangspore in der A-Kette des Holoenzym. Die an der Porenbildung beteiligten Aminosäuren sind als *sticks* abgebildet. (B) Oberflächendarstellung der identischen Position in der L-Kette. (C) L-Kette ohne das  $M_{303-B}$ -Konformer.

Die Porenanalysen brachten neue Einblicke in die potentiellen Substrat- und Produktwege innerhalb der *HnSOR*. Die Vermessung des Tetramerkans konnte dessen Funktion als Substrateingang weder eindeutig bestätigen, noch widerlegen. Hingegen kann der Trimerkanal aufgrund des geringen Porendurchmessers nicht weiter als Ausgang der SOR-Produkte aus dem Enzym angesehen werden. Bestätigt wurde die Existenz mehrerer Verbindungen zwischen innerer Kavität und aktivem Zentrum. Sowohl die zur *AaSOR* analogen, aber durch die Lokalisierung von  $Q_{47}$  als geschlossen erscheinende Eingangspore, als auch die in der vorläufigen Kristallstruktur als Ausgangspore interpretierte Öffnung wurden in ihrer Existenz bestätigt. Zudem gelang es eine neue Pore in der *HnSOR* zu identifizieren, deren Öffnungszustand von der  $M_{303}$ -Konformation

abhängt. Diese Pore wurde bislang bei keiner anderen SOR beobachtet und ist aufgrund ihrer Lokalisierung unmittelbar am essentiellen CSS<sub>33</sub> von besonderem Interesse.

#### 7.2.4. Das aktive Zentrum der *Hn*SOR

Die erhöhte Auflösung und detailliertere Elektronendichtekarte half, das katalytische Zentrum der *Hn*SOR besser zu charakterisieren. Die zusätzliche Elektronendichte am  $\gamma$ -Schwefelatom von C<sub>33</sub>, die auf eine Persulfurierung des Cysteins hindeutet, wurde auch in der neuen Kristallstruktur in allen 24 Untereinheiten gefunden (Abb. 61 A).



**Abbildung 61:** Stick-Darstellungen der konservierten Cysteine in der *Hn*SOR. (A) C<sub>33</sub> am Beispiel der A-Untereinheit. (B) C<sub>103</sub> + C<sub>106</sub> am Beispiel der G-Untereinheit. (C) C<sub>103</sub> + C<sub>106</sub> am Beispiel der Q-Untereinheit. Die 2  $F_o - F_c$  Elektronendichtekarte ist mit einem Konturierungslevel von 1,0  $\sigma$  als cyanfarbenes Netz abgebildet.

Auch die anderen beiden konservierten Cysteine C<sub>103</sub> und C<sub>106</sub> weisen eine zusätzliche Elektronendichte am  $\gamma$ -Schwefelatom auf und wurden ebenso als Cysteinpersulfid interpretiert (Abb. 61 B). Die Orientierung der terminalen  $\delta$ -Schwefelatome von CSS<sub>103</sub> und CSS<sub>106</sub> variiert dabei in den 24 kristallographisch unabhängigen Untereinheiten. Dadurch ergaben sich Distanzen zwischen beiden  $\delta$ -Schwefelatomen von 1,44 Å bis 4,29 Å. In 13 der 24 Untereinheiten deuten die Elektronendichtekarte und die mittleren Distanzen zwischen den terminalen  $\delta$ -Schwefelatomen von 2,0 Å (min. 1,44 Å / max. 2,34 Å) auf eine kovalente Bindung hin (Abb. 61 C). Der Abstand ähnelt dem der kovalenten Bindung zwischen  $\gamma$ - und  $\delta$ -Schwefelatom von CSS<sub>33</sub> mit 2,02 Å. Die Abstände der Schwefelatome der drei konservierten Cysteine zum mononukleären Eisenatom wurden ermittelt und mit den entsprechenden Distanzen in der *Aa*SOR verglichen (Tab. 24). In der *Hn*SOR beträgt die mittlere Distanz des terminalen  $\delta$ -Schwefelatoms von CSS<sub>33</sub> zum mononukleären Eisen 8,2 Å und ist damit um 0,7 Å geringer als in der *Aa*SOR. Der Abstand des  $\gamma$ -Schwefelatoms von CSS<sub>103</sub> beträgt 8,28 Å. In der *Aa*SOR ist die entsprechende Distanz vom Eisen zum  $\gamma$ -Schwefelatom von C<sub>101</sub> mit 7,8 Å um 0,44 Å geringer. Das  $\gamma$ -Schwefelatom des CSS<sub>106</sub> der *Hn*SOR ist 12,45 Å vom Eisenatom entfernt, wohingegen das  $\gamma$ -Schwefelatom von C<sub>104</sub> in der *Aa*SOR mit 12,7 Å um 0,25 Å weiter vom Eisen entfernt ist. Da die beiden Cysteine C<sub>101</sub> und C<sub>104</sub>

der AaSOR keine Persulfurierung aufweisen, konnten keine Vergleiche der Distanzen der  $\delta$ -Schwefelatome erfolgen (Urich, 2005c).

Eine Persulfurierung der beiden Cysteine C<sub>103</sub> und C<sub>106</sub> wurde weder bei der vorläufigen Kristallstruktur der HnSOR, noch bei den entsprechenden Cysteinen in einer der existierenden Kristallstrukturen der AaSOR zuvor beobachtet. Der Abstand zwischen den terminalen  $\delta$ -Schwefelatomen lässt auf eine kovalente Bindung schließen, wonach beide Cysteine über eine Tetrasulfidbrücke miteinander verbunden wären.

**Tabelle 24:** Distanzen der Schwefelatome der drei konservierten Cysteine zum mononukleären Eisenatom in HnSOR und AaSOR. Aufgelistet sind die mittleren Distanzen aus 24 Untereinheiten sowie der minimal und maximal gemessene Abstand in Klammern.

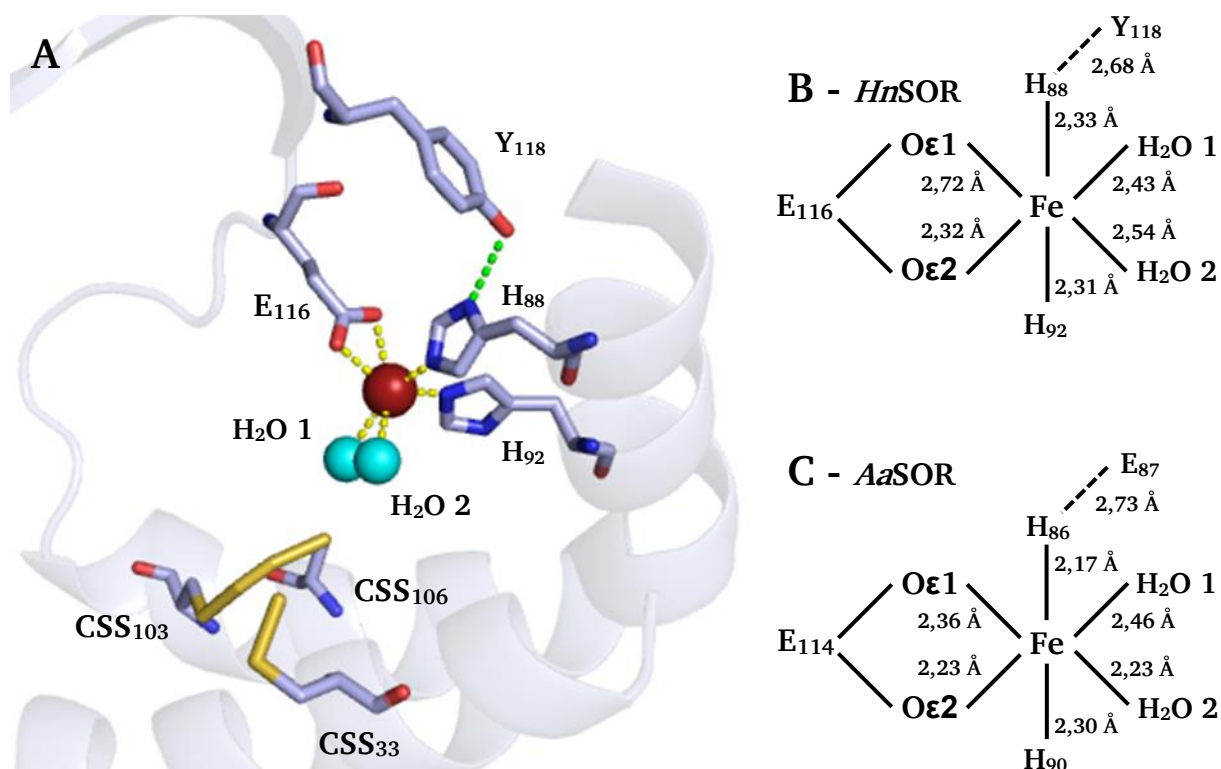
<b>Distanzen zum mononukleären Eisenzentrum</b>	
CSS <sub>33</sub> $\delta$ -S-Atom (HnSOR)	8,20 Å (min. 7,87 Å / max. 8,48 Å)
CSS <sub>103</sub> $\delta$ -S-Atom (HnSOR)	8,62 Å (min. 7,83 Å / max. 9,13 Å)
CSS <sub>103</sub> $\gamma$ -S-Atom (HnSOR)	8,28 Å (min. 7,97 Å / max. 8,62 Å)
CSS <sub>106</sub> $\delta$ -S-Atom (HnSOR)	10,73 Å (min. 10,11 Å / max. 11,86 Å)
CSS <sub>106</sub> $\gamma$ -S-Atom (HnSOR)	12,45 Å (min. 11,79 Å / max. 13,1 Å)
CSS <sub>31</sub> $\delta$ -S-Atom (AaSOR)	8,9 Å
Cys <sub>101</sub> $\gamma$ -S-Atom (AaSOR)	7,8 Å
Cys <sub>104</sub> $\gamma$ -S-Atom (AaSOR)	12,7 Å

Die primäre Koordinationssphäre des Eisenatoms im aktiven Zentrum wird von den Liganden H<sub>88</sub>, H<sub>92</sub> und E<sub>116</sub> gebildet (Abb. 62). In der ersten HnSOR-Kristallstruktur war, im Gegensatz zur AaSOR, in 7 von 24 Untereinheiten nur ein Wassermolekül als Teil der primären Koordinationssphäre gefunden worden (Veith, 2011a). In den restlichen Untereinheiten war kein Wassermolekül erkennbar. Vermutlich aufgrund der verbesserten Auflösung umfasst die Koordinationssphäre des Eisens in der neuen Kristallstruktur zwei Wassermoleküle in 15 von 24 Untereinheiten, wie es bereits bei der AaSOR beobachtet worden war (Urich *et al.*, 2005c). In den übrigen 9 Untereinheiten wies die Elektronendichtekarte auf lediglich ein Wassermolekül hin. Die Abstände der entsprechenden Liganden zum zentralen Eisenatom sind in Abbildung 62 angegeben und denen der AaSOR gegenübergestellt.

Die sekundäre Koordinationssphäre der HnSOR wird durch die Seitenkette von Y<sub>118</sub> gebildet, dessen Hydroxylgruppe sich mit 2,68 Å (mittlere Distanz von 24 kristallographisch unabhängigen Untereinheiten) in Wasserstoffbrückendistanz zum  $\delta$ 1-Stickstoffatom von H<sub>88</sub> befindet (Abb. 62). In der AaSOR wird diese Funktion von der Carboxylgruppe der E<sub>87</sub>-Seitenkette übernommen. Das  $\epsilon$ 2-Sauerstoffatom der Carboxylgruppe des homologen E<sub>89</sub> befindet sich bei der HnSOR hingegen mit einem mittleren Abstand von 4,18 Å (min. 4,06 Å / max. 4,33 Å) in einer zu großen Distanz

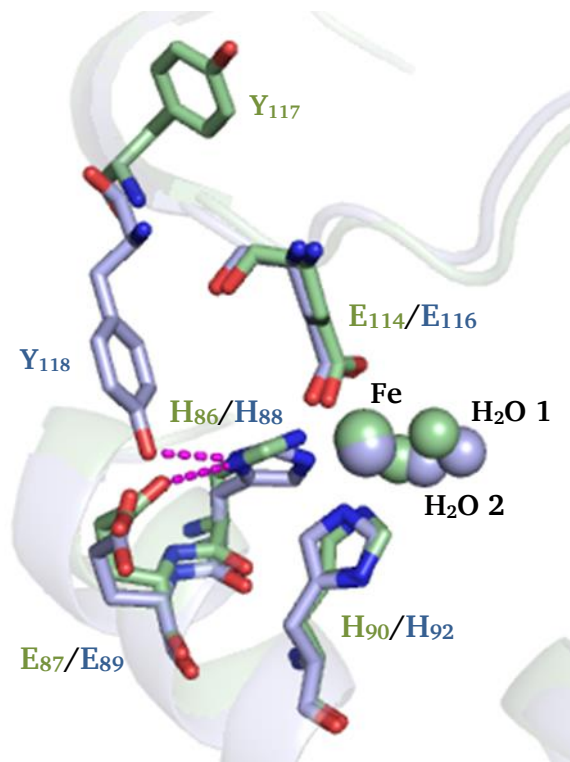


für die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Anstelle von Y<sub>118</sub> besitzt die AaSOR an gleicher Stelle ein Isoleucin (I<sub>116</sub>), das nicht zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken geeignet ist.

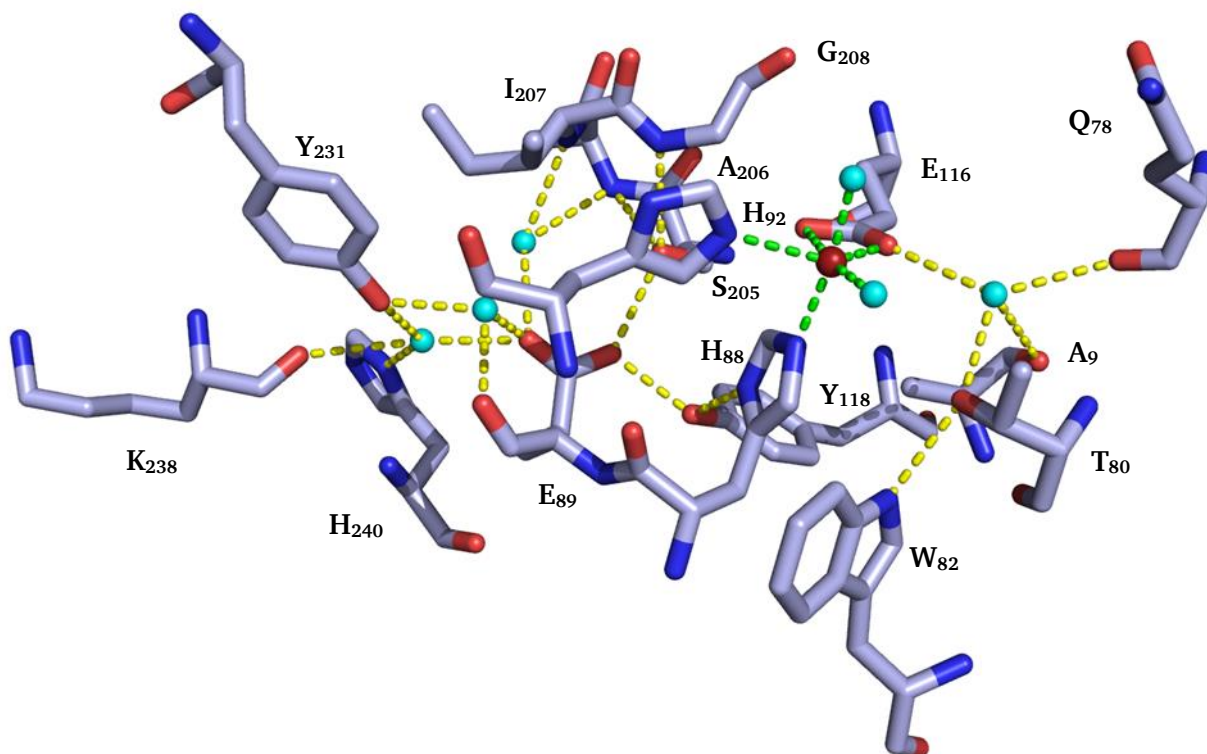


**Abbildung 62:** Das aktive Zentrum der *HrrSOR*. **(A)** Stick-Darstellung der an der Bildung der primären und sekundären Koordinationssphäre (gelb/grün gestrichelte Linien) beteiligten Aminosäuren und der drei konservierten Cysteine. Das Eisenatom ist als rote Kugel, die beiden Wassermoleküle sind als Kugeln in Cyan abgebildet. **(B+C)** Schematische Darstellungen der Eisenzentren in *HrrSOR* **(B)** und *AaSOR* **(C)**. Die Distanzen der entsprechenden Liganden sind als schwarze Linien abgebildet. Die Abstände sind Mittelwerte aus 24 bzw. 6 kristallographisch unabhängigen Untereinheiten bei der *HrrSOR* und *AaSOR*.

Das direkt daneben gelegene Y<sub>117</sub> weist eine andere Orientierung und eine zu große räumliche Distanz zu H<sub>86</sub> auf und ist daher nicht an der sekundären Koordinationssphäre beteiligt (Abb. 63). Neben der Aminosäure Y<sub>118</sub>, welche die sekundäre Koordinationssphäre der *HrrSOR* bildet und über eine Wasserstoffbrückenbindung direkt Einfluss auf den Eisenliganden H<sub>88</sub> nimmt, wurde im aktiven Zentrum der *HrrSOR* ein potientiell Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen identifiziert (Abb. 64). Ein solches Wasserstoffbrückennetzwerk war bereits für das aktive Zentrum der *AaSOR* postuliert und die Relevanz einiger dieser Wasserstoffbrückeninteraktionen für die Enzymaktivität der SOR bestätigt worden (Veith, 2011a; Kap. 2.5.3). Für die Analysen wurden mittels PyMOL polare Interaktionspartner gesucht, deren Abstand untereinander maximal etwa 3 Å beträgt.



**Abbildung 63:** Überlagerung der primären und sekundären Koordinationssphäre von *AaSOR* (hellgrün) und *HrsOR* (hellblau) in der *Stick*-Darstellung. Das Eisenatom und die Wassermoleküle sind als Kugeln, die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen E<sub>87</sub> und H<sub>86</sub> sowie zwischen Y<sub>118</sub> und H<sub>88</sub> als gestrichelte Linien in Magenta abgebildet.



**Abbildung 64:** Putatives Wasserstoffbrückennetzwerk (gelb gestrichelte Linien) und Koordinationssphäre des Eisens (grün gestrichelte Linien) im aktiven Zentrum der *HrsOR*. Die Wassermoleküle sind als cyanfarbene Kugeln dargestellt.

Insgesamt wurden 20 polare Interaktionspartner gefunden, die potentiell in der Lage sind, Wasserstoffbrückenbindungen untereinander auszubilden (Tab. 25). Basierend auf der Distanz zwischen dem Carbonylsauerstoff von Q<sub>78</sub> und dem Carbonylsauerstoff von K<sub>238</sub> erstreckt sich das putative Wasserstoffbrückennetzwerk über einen Bereich von durchschnittlich 20,0 Å (min. 19,8 Å / max. 20,1 Å). Im Zentrum dieses Wasserstoffbrückennetzwerks befindet sich E<sub>89</sub>, das über fünf Wasserstoffbrückenbindungen in direktem Kontakt mit drei Wassermolekülen, S<sub>205</sub> und Y<sub>118</sub> steht. Wie bereits beschrieben bildet Y<sub>118</sub> die sekundäre Koordinationssphäre der HnSOR und beeinflusst möglicherweise über eine Wasserstoffbrückenbindung direkt den Eisenliganden H<sub>88</sub>. Über die drei Wassermoleküle steht E<sub>89</sub> wiederum in Kontakt mit den Aminosäuren A<sub>206</sub>, I<sub>207</sub>, Y<sub>231</sub>, K<sub>238</sub> und H<sub>240</sub>. Auf der gegenüberliegenden Seite der aktiven Tasche befindet sich ein weiteres Wassermolekül, das über Wasserstoffbrückenbindungen in Kontakt mit A<sub>9</sub>, Q<sub>78</sub>, T<sub>80</sub> und W<sub>82</sub> steht. Die Tatsache, dass die Wassermoleküle als geordnete Strukturen im aktiven Zentrum der HnSOR auftreten, spricht für die Existenz der beschriebenen Wasserstoffbrückenbindungen in der aktiven Tasche.

**Tabelle 25:** Übersicht der putativen Wasserstoffbrückenbindungen im aktiven Zentrum des A-Monomers der HnSOR. Ausgewählt wurden polare Interaktionspartner, deren Abstand maximal 3,1 Å beträgt.

Interagierende Moleküle		Distanz (Å)
E <sub>116</sub> (ε2-Sauerstoff) <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>840</sub>	2,88
H <sub>2</sub> O <sub>840</sub>	T <sub>80</sub> (γ-Sauerstoff)	2,63
H <sub>2</sub> O <sub>840</sub>	A <sub>9</sub> (Carbonylsauerstoff)	3,01
H <sub>2</sub> O <sub>840</sub>	Q <sub>78</sub> (Carbonylsauerstoff)	3,07
T <sub>80</sub> ( γ-Sauerstoff)	W <sub>80</sub> (ε1-Stickstoff)	2,82
Y <sub>118</sub> (Hydroxylgruppe) <sup>b</sup>	H <sub>88</sub> (δ1-Stickstoff) <sup>a</sup>	2,64
Y <sub>118</sub> (Hydroxylgruppe) <sup>b</sup>	E <sub>89</sub> (ε2-Sauerstoff)	2,49
E <sub>89</sub> (ε2-Sauerstoff)	S <sub>205</sub> (γ-Sauerstoff)	2,79
S <sub>205</sub> (γ-Sauerstoff)	G <sub>208</sub> (Amidstickstoff)	2,97
E <sub>89</sub> (ε1-Sauerstoff)	H <sub>2</sub> O <sub>631</sub>	2,73
E <sub>89</sub> (ε1-Sauerstoff)	H <sub>2</sub> O <sub>1992</sub>	2,83
E <sub>89</sub> (ε1-Sauerstoff)	H <sub>2</sub> O <sub>531</sub>	2,74
H <sub>2</sub> O <sub>1992</sub>	A <sub>206</sub> (Amidstickstoff)	3,01
H <sub>2</sub> O <sub>1992</sub>	I <sub>207</sub> (Amidstickstoff)	2,77
H <sub>2</sub> O <sub>631</sub>	Y <sub>231</sub> (Hydroxylgruppe)	2,98
H <sub>2</sub> O <sub>631</sub>	K <sub>238</sub> (Carbonylsauerstoff )	3,07
H <sub>2</sub> O <sub>631</sub>	H <sub>240</sub> (δ1-Stickstoffatom)	2,79
H <sub>2</sub> O <sub>531</sub>	E <sub>89</sub> (Carbonylsauerstoff )	2,66
H <sub>2</sub> O <sub>531</sub>	Y <sub>231</sub> (Hydroxylgruppe)	2,58
H <sub>2</sub> O <sub>531</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>1992</sub>	2,58

<sup>a</sup> Eisenligand

<sup>b</sup> Sekundäre Koordinationssphäre

---

## 7.3. Diskussion

### 7.3.1. Kristallisation und strukturelle Analyse

Erste Untersuchungen zur Proteinarchitektur der *HnSOR* wiesen bereits in einer früheren Arbeit auf eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur SOR aus *Acidianus ambivalens* hin (Veith, 2011a; 2011b). In beiden Enzymen bildet ein aus acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehendes  $\beta$ -barrel den Kern einer jeden Untereinheit und wird von neun  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Um strukturelle Unterschiede besser analysieren zu können, wurden die Kristallisation und Röntgenstrukturanalysen der *HnSOR* in dieser Arbeit wiederholt. Die Auflösung der Kristallstruktur konnte von 2,9 Å auf 2,1 Å verbessert werden. Dies ermöglichte eine detailliertere Analyse der Grundarchitektur, der primären und sekundären Koordinationssphäre des Eisenzentrums sowie die Überprüfung der in der vorangegangenen Arbeit postulierten Substrat- und Produktwege innerhalb des Enzyms.

Die sehr ähnliche Quartärstruktur von *HnSOR* und *AaSOR* wurde ebenfalls in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beider Enzyme mit Uranylacetat-Negativkontrastierung beobachtet. Beide Enzyme wiesen eine globuläre Form auf und besaßen einen vergleichbaren Durchmesser. Wie auch die *AaSOR* kristallisierte die *HnSOR* als Icosatetramer. Unterschiede zeigten sich im Kristallisationsverhalten beider Enzyme. Die Dimensionen der Elementarzelle, in der die *HnSOR* kristallisierte, sind mit  $a = 200,84$  Å,  $b = 212,45$  Å und  $c = 215,98$  Å deutlich größer als bei der *AaSOR* ( $a=b= 162,15$  Å,  $c = 154,92$  Å; Urich, 2005c). Der Proteingehalt der *AaSOR*-Elementarzelle umfasste zwei *AaSOR*-Holoenzyme, wohingegen der Proteingehalt der *HnSOR*-Elementarzelle vier Holoenzymen entspricht. Somit ist der Proteingehalt in der orthorhombischen, flächenzentrierten Elementarzelle der *HnSOR* doppelt so hoch, wie in der tetragonalen, raumzentrierten Elementarzelle der *AaSOR*. Der Wildtyp der *AaSOR* kristallisierte in einer sechs Monomere umfassenden asymmetrischen Einheit, wohingegen die asymmetrische Einheit der *HnSOR* in der vorliegenden Arbeit und der vorangegangenen Dissertation 24 kristallographisch unabhängige Monomere beinhaltete (Veith, 2011a). Dies stellt einen fundamentalen Unterschied im Kristallisationsverhalten beider Enzyme dar.

Auf der Ebene der Kristallstruktur wurde der Anteil an Sekundärstrukturelementen quantifiziert. Die Analyse ergab eine Vorhersage von 26,7 %  $\alpha$ -Helices und 31,6 %  $\beta$ -Faltblätter und entspricht damit in etwa der Vorhersage der vorangegangenen *HnSOR*-Struktur mit 2,9 Å Auflösung (Veith, 2011a). Die Kristallstruktur der *AaSOR* hingegen umfasst einen Anteil von 35,9 % helikalen Regionen und 30,4 %  $\beta$ -Faltblätter (Urich, 2005c). Der höhere Anteil an helikalen Regionen deckt sich mit der Beobachtung, dass die Struktur der *AaSOR* drei kurze helikale Regionen enthält, die in der *HnSOR*-Struktur nicht vorhanden sind. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Strukturen stellt eine kurze Insertion in der Aminosäuresequenz der *HnSOR* dar. Diese umfasst in

---

der Überlagerung der  $\alpha$ -Kohlenstoffketten beider Kristallstrukturen etwa acht Aminosäuren. Bis auf diese beiden Merkmale ist die Proteinarchitektur beider Enzyme sehr ähnlich, was durch den niedrigen RMSD-Wert von 1,09 bestätigt wurde.

Die Stabilität der *HnSOR* wurde bereits mittels reversibler thermischer Denaturierung via CD-Spektroskopie untersucht und mit der *AaSOR* verglichen. Dabei lag der Schmelzpunkt der *HnSOR* zwischen 50 und 60 °C und somit rund 20 K unter dem der *AaSOR*, was auf eine geringere Thermostabilität der *HnSOR* hindeutet (Veith, 2012). Einen weiteren Hinweis auf die geringere Thermostabilität der *HnSOR* liefert die Untersuchung der Salzbrücken innerhalb des Enzyms. Die exemplarische Analyse des A-Monomers ergab neun Salzbrücken innerhalb dieser Untereinheit und vier weitere Ionenbindungen, mit denen sie mit zwei von fünf angrenzenden Untereinheiten verbunden ist. Ein Monomer der *AaSOR* besitzt hingegen 15 interne Salzbrücken und steht mit den angrenzenden Untereinheiten über insgesamt sechs Ionenbindungen in Kontakt (Urich, 2005c). Diese niedrigere Anzahl an Ionenbindungen scheint mit der geringeren Thermostabilität der *HnSOR* in Verbindung zu stehen.

### 7.3.2. Poren und Kanäle in der *HnSOR*

Bereits in früheren Arbeiten wurde eine allgemeingültige Route für Substrate und Produkte in der *SOR* postuliert, bei der lineare Schwefelspezies durch die Tetramerkanäle in die innere Kavität der *SOR* und durch eine Eingangspore weiter ins aktive Zentrum der Untereinheiten gelangen. Nach der Katalyse gelangen die Produkte über die Ausgangspore aus dem aktiven Zentrum und verlassen über einen Trimerkanal das Enzym (Veith, 2011a, b).

Die aktuelle Kristallstruktur der *HnSOR* wurde in dieser Arbeit auf die Anwendbarkeit dieser postulierten Substrat- und Produkttrouten und auf die Existenz möglicher alternativer Poren und Kanäle überprüft. Bislang erfolgten die Suche nach Poren und Kanälen innerhalb der verschiedenen *SOR*-Spezies und die Ermittlung der zugehörigen Durchmesser durch einfache Abstandsmessungen zwischen den an der Porenbildung beteiligten Aminosäuren. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die putativen Poren und Kanäle in einer *SOR* nicht nur ausschließlich anhand ihrer visuellen Erscheinung in der Kristallstruktur und der Abstände einzelner Aminosäuren beurteilt, sondern auch systematisch mit Hilfe der Programme MOLE (Sehna *et al.*, 2013), CAVER Analyst (Kozlikova *et al.*, 2014) und dem PyMOL Plugin CAVER (Chovancova *et al.*, 2012) gesucht und analysiert.

Die an den Vierfachsymmetrieachsen lokalisierten und mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleideten Tetramerkanäle wurden bislang als wahrscheinlichster Zugang zur inneren Kavität der *SOR* angesehen. In der *HnSOR* wird der Durchmesser dieser potentiellen Kanäle durch einen äußeren Phenylalaninring (F<sub>143</sub>) im oberen Bereich des Kanals limitiert. Zur inneren hydrophoben

---

Oberfläche tragen noch jeweils ein Leucin(L<sub>139</sub>)-, Valin(V<sub>135</sub>)- und Methioninring (M<sub>132</sub>) bei. Verglichen mit der vorherigen Kristallstruktur der *HnSOR* wurden in der aktuellen Struktur nur geringfügige Unterschiede in den mittleren Distanzen der einzelnen Aminosäuren innerhalb eines Rings festgestellt. Die so ermittelten Durchmesser betrugen für den an der Basis gelegenen Methioninring 10,0 Å, für den darüber gelegenen Valinring 11,2 Å und 5,2 Å beim mittleren Leucinring. Mit 5,0 Å limitiert der äußere Phenylalaninring den Durchmesser der potentiellen Pore. Bei dieser und den in früheren Arbeiten durchgeführten Ermittlungen von Porendurchmesser wurde jedoch lediglich die Distanz der direkt gegenüberliegenden Kohlenstoffatome der einzelnen Aminosäuren bestimmt. Mit Hilfe von CAVER Analyst wurde versucht, die Durchmesser der engsten Durchlässe der jeweiligen Ringe zu präzisieren. Für die F-, L-, V- und M-Ringe ergaben sich Durchmesser von 1,6 Å, 1,94 Å, 7,6 Å bzw. 6,67 Å. Die mit CAVER Analyst ermittelten Porendurchmesser sind somit deutlich geringer, unter anderem, weil hier auch die Wasserstoffatome der Seitenketten in die Berechnung mit einbezogen werden. Im Gegensatz dazu wurde der Kanal von MOLE überhaupt nicht als solcher erkannt. Trotz Variation der Analyseparameter passierte die Sonde unter keiner der gewählten Bedingungen den F- und L-Ring.

Als Austrittspunkte der durch die Katalyse gebildeten Produkte wurden die an den Dreifachsymmetrieachsen lokalisierten Poren vermutet. In der *HnSOR* werden diese Poren von den Aminosäuren A<sub>226</sub> und E<sub>101</sub> gebildet. Die Abstandsmessung der terminalen C<sub>β</sub>-Atome von den die Porengröße limitierenden Alanin-Seitenketten ergab im Mittel 3,9 Å und deckt sich damit mit den Beobachtungen der vorläufigen Kristallstruktur (Veith, 2011a). Der Abstand ist vergleichbar mit der *AaSOR*, wo die Distanz 4,0 Å beträgt. Während in der *AaSOR* Salzbrücken zwischen R<sub>99</sub> und E<sub>228</sub> die Untereinheiten an den Dreifachsymmetrieachsen stabilisieren, werden bei der *HnSOR* lediglich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen N<sub>227</sub> und E<sub>101</sub> bzw. E<sub>101</sub> und A<sub>226</sub> ausgebildet. Dies könnte die Porenöffnung der *HnSOR* flexibler gestalten und zur höheren Aktivität des Enzyms gegenüber der *AaSOR* beitragen (Veith, 2011a). Die Überprüfung des an der A-Untereinheit lokalisierten Trimerkanals mittels CAVER Analyst und MOLE ergab einen Porendurchmesser von lediglich 1,24 Å bzw. 1,22 Å am engsten Punkt zwischen den Alanin-Seitenketten, was an der Funktion als Kanal zweifeln lässt.

Neben den Trimer- und Tetramerkkanälen wurden auch die Poren untersucht, welche das aktive Zentrum mit der zentralen Kavität des Holoenzym verbinden. Die Eingangspore zum aktiven Zentrum wird bei der *AaSOR* von den Aminosäuren F<sub>32</sub>, M<sub>296</sub> und M<sub>297</sub> gebildet. Visuell ist an der entsprechenden Position der *HnSOR* keine Porenöffnung erkennbar. An den Positionen der porenbildenden Aminosäuren der *AaSOR* sind in der *HnSOR* die Aminosäuren M<sub>25</sub>, M<sub>302</sub> und M<sub>303</sub> lokalisiert. Zwischen den genannten Aminosäuren befindet sich ein Glutaminrest (Q<sub>47</sub>), wodurch



---

eine Verbindung mit der dahinter gelegenen aktiven Tasche blockiert erscheint. In der AaSOR befindet sich an entsprechender Stelle ein Asparagin (N<sub>45</sub>), was aber aufgrund seiner Orientierung nicht in die Porenöffnung hineinragt und somit Zugang zum aktiven Zentrum ermöglicht. M<sub>302</sub> existiert in der HnSOR in allen Untereinheiten in zwei möglichen Konformationen. Eine konformationsabhängige Öffnung der Pore konnte jedoch nicht beobachtet werden. Mit dem PyMOL *Plugin* CAVAR wurde geprüft, ob eine Verbindung zwischen dem inneren Hohlraum der HnSOR und dem aktiven Zentrum an entsprechender Position dennoch möglich ist. Dabei wurde am Ort der möglichen Pore eine Verbindung zwischen innerer Kavität der SOR und der aktiven Tasche mit einem Durchmesser von 1,92 Å am engsten Punkt festgestellt. Der Porendurchmesser wird dabei primär durch Q<sub>47</sub> sowie M<sub>25</sub> und dem *backbone* der zugehörigen Helix begrenzt. Die Existenz der Pore scheint daher wahrscheinlich zu sein.

Die bereits in der ersten Kristallstruktur der HnSOR identifizierte Pore zum aktiven Zentrum, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe zum Trimerkanal als Ausgangspore für die umgesetzten Produkte angesehen wird, wurde in der neuen Kristallstruktur bestätigt. Sie wird von den Seitenketten der Aminosäuren F<sub>100</sub>, F<sub>210</sub>, L<sub>107</sub> und S<sub>104</sub> gebildet. Eine Analyse mit CAVAR Analyst ergab einen minimalen Porendurchmesser von 2,8 Å.

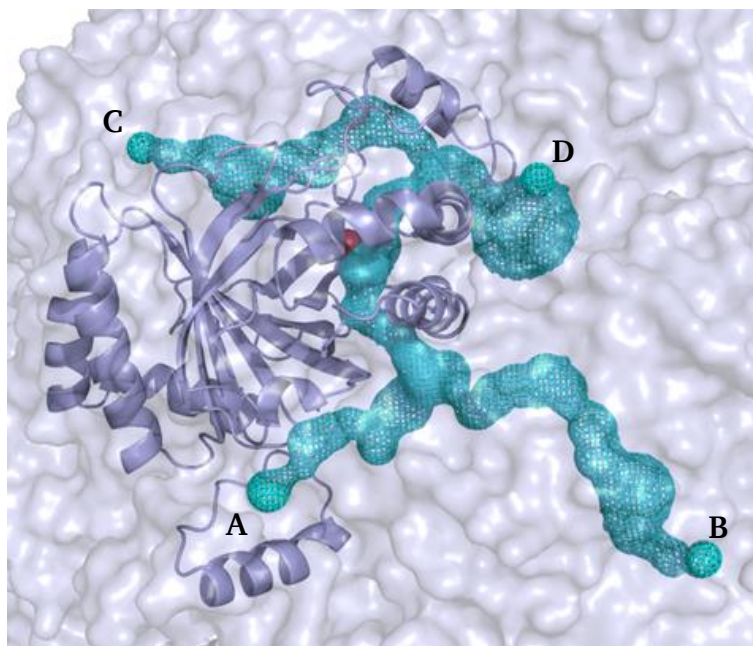
Neben diesen beiden möglichen Poren wurde noch ein dritter potentieller Zugang zum aktiven Zentrum der HnSOR identifiziert, die bisher bei keiner anderen SOR beobachtet wurde. Die Pore wird von den Seitenketten der Aminosäuren P<sub>30</sub>, F<sub>45</sub> und M<sub>303</sub> gebildet und verläuft direkt am persulfurierten C<sub>33</sub> vorbei. Es stellte sich heraus, dass M<sub>303</sub> in drei möglichen Konformationen in der Kristallstruktur vorkommt und eine Öffnung dieser Pore durch dessen Konformationen bestimmt wird. Die Pore erscheint im Falle des M<sub>303-B</sub>-Konformers als geschlossen, wohingegen eine Öffnung mit den Konformeren M<sub>303-A</sub> und M<sub>303-C</sub> erfolgt. Mittels CAVAR Analyst wurde die Porengröße in Abhängigkeit der verschiedenen M<sub>303</sub>-Konformationen exemplarisch an jeweils einer Untereinheit ermittelt. Der Porendurchmesser betrug am engsten Punkt 2,9 Å für das A-Konformer, 1,6 Å für das B-Konformer und 3,1 Å für das C-Konformer. Da keine Untereinheit eine Elektronendichte aufwies, die lediglich auf das Vorhandensein des C-Konformers hindeutet, erfolgte diese Messung durch vorherige Entfernung der alternativen B-Konformation von M<sub>303</sub> in der entsprechenden Untereinheit. Somit existieren zwei Konformationen von M<sub>303</sub>, bei denen eine Verbindung zwischen innerer Kavität der SOR und der aktiven Tasche möglich ist. Mit einem kalkulierten Durchmesser von 2,9 bzw. 3,1 Å besitzt diese Pore eine ähnliche Größe wie die postulierte Ausgangspore mit 2,8 Å. Sie stellt mit einer höheren Wahrscheinlichkeit den Zugang zur aktiven Tasche dar als die bislang vermutete Eingangspore. Zudem befindet sie sich unmittelbar neben CSS<sub>33</sub>, der putativen Substratbindungsstelle. Diese räumliche Nähe der Pore

---

zum aktiven Zentrum und der damit verkürzte Weg des Substrats zum katalytischen Zentrum könnten zur höheren Aktivität der *HnSOR* gegenüber der *AaSOR* beitragen.

Die Größen der Ausgangspore aus dem aktiven Zentrum und der neu beschriebenen potentiellen Eingangspore liegen deutlich über den Porendurchmessern der Trimer- und Tetramerkanäle der *HnSOR*. Die Analyse der Porendurchmesser an den limitierenden Stellen der Kanäle ergab für den Tetramerkanal einen Durchmesser von 1,6 Å und für den Trimerkanal zwischen 1,22 und 1,24 Å. Die Porengröße ist somit stellenweise geringer als der Durchmesser eines Schwefelatoms mit 1,8 Å (berechnet; Clementi, 1967) bis etwa 2,0 Å (empirisch bestimmt; Slater, 1964). Zudem übersteigt die Größe einer Polysulfidkette oder eines Sulfitmoleküls die Größe eines einzelnen Schwefelatoms. Daher ist fraglich, ob die Substrate und Produkte die beschriebenen Kanäle an den Symmetrieachsen passieren könnten. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass die Kristallstrukturen lediglich Momentaufnahmen der strukturellen Konformation der Enzyme abbilden und keine Flexibilität und Dynamik der einzelnen Aminosäuren mit einbeziehen. Es ist von einem divergenten Verhalten des Enzyms bei einem Temperaturoptimum von 80 °C und bei der Temperatur der Diffraktionsmessung bei rund -173 °C (100 K) auszugehen, was möglicherweise eine Vergrößerung des Porendurchmessers unter Reaktionsbedingungen bewirkt. Obwohl die Kristallstruktur lediglich eine Momentaufnahme darstellt, enthält sie dennoch Informationen über dynamische Prozesse im Kristall in Form des B-Faktors. Der B-Faktor liefert anhand der räumlichen Ausdehnung der Elektronenwolken Hinweise über die Mobilität jedes Atoms in der Struktur. Der B-Faktor des terminalen  $\beta$ -C-Atoms von A<sub>226</sub>, der die Porengröße limitierende Rest des Trimerkanals, weist mit durchschnittlich 43,65 Å<sup>2</sup> (min. 30,4 Å<sup>2</sup>/max. 52,9 Å<sup>2</sup>) einen vergleichsweise niedrigen Wert auf und deutet auf eine geringe Flexibilität hin. In Kombination mit dem sehr geringen Porendurchmesser von rund 1,2 Å kann hieraus abgeleitet werden, dass der Trimerkanal vermutlich keine geeignete Pore in der *HnSOR* darstellt. Eine andere Situation ergibt sich für den Tetramerkanal, dessen Durchmesser durch den Phenylalaninring limitiert wird. Die Atome der des Phenylalaninrings (F<sub>143</sub>) besitzen mit 84,85 Å<sup>2</sup> (min. 61,1 Å<sup>2</sup>/max. 102,9 Å<sup>2</sup>) einen vergleichsweise hohen B-Faktor, was auf eine erhöhte Flexibilität des Phenylalaninrings hindeutet. Zum Vergleich liegen die B-Faktoren der terminalen C-Atome des Valin- und Leucinrings mit durchschnittlich 33,43 Å<sup>2</sup> (min. 26,1 Å<sup>2</sup>/max. 48,7 Å<sup>2</sup>) und 55,51 Å<sup>2</sup> (min. 43,3 Å<sup>2</sup>/max. 68,9 Å<sup>2</sup>) deutlich unter diesem Wert. Die terminalen C-Atome der M<sub>132</sub>-Seitenketten besitzen aufgrund der Größe der zugehörigen Seitenkette mit 100,37 Å<sup>2</sup> (min. 63,1 Å<sup>2</sup>/max. 126,4 Å<sup>2</sup>) einen erwartungsgemäß hohen B-Faktor, da die Flexibilität der Seitenketten mit zunehmender Kettenlänge ansteigt. Der kalkulierte Porendurchmesser von 1,6 Å könnte sich daher durch diese Flexibilität erhöhen und den Zugang für lineare Schwefelspezies ermöglichen. Diese Hypothesen müssten jedoch erst durch Molekulardynamik-Simulationen überprüft werden, um so die Funktion

der beschriebenen Kanäle zu bestätigen oder zu widerlegen. Dennoch stellt sich die Frage, ob nicht andere Wege zur Substrataufnahme und Produktabgabe existieren, die bislang nicht beachtet wurden. Hierzu wurde mit MOLE nach möglichen weiteren, bislang unbekannten Kanälen gesucht, welche ausgehend vom aktiven Zentrum mit der Oberfläche des Enzyms in Verbindung stehen (Abb. 65). Startpunkt der Analyse stellte das Eisenzentrum der A-Untereinheit dar.

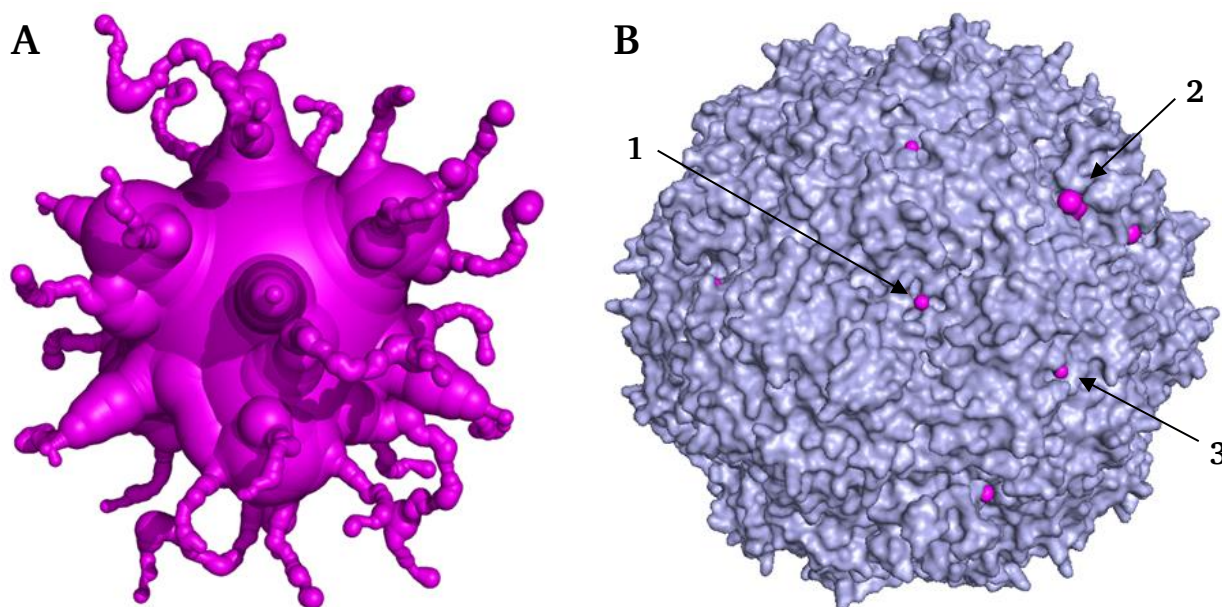


**Abbildung 65:** Ergebnisse der Analyse mit MOLE zur Suche nach Kanälen, die vom aktiven Zentrum der *HrnSOR* an die Oberfläche des Holoenzym führen. Die A-Untereinheit der *HrnSOR* ist exemplarisch als *Cartoon* dargestellt. Ausgehend vom Eisenzentrum (rote Kugel) wurden 4 potentielle Kanäle (cyanfarbenes Netz) identifiziert. Die Kanäle A und B sind über die neu beschriebene Eingangspore mit dem aktiven Zentrum verbunden. Die Kanäle C und D stehen über die Ausgangspore mit dem aktiven Zentrum in Verbindung.

Es wurden vier potentielle Kanäle identifiziert, die in Verbindung mit dem aktiven Zentrum der A-Untereinheit stehen und an die Enzymoberfläche gelangen können. Die Kanäle A und B stehen über die neu beschriebene Eingangspore mit dem aktiven Zentrum in Kontakt, wohingegen die Kanäle C und D über die Ausgangspore an die Enzymoberfläche führen. Die Kanäle B und C treten durch die gleiche Porenöffnung, aber an unterschiedlichen Stellen des Holoenzym, an die Oberfläche. Um ein Gesamtbild aller potentiellen Kanäle zu erhalten, über die die zentrale innere Kavität der *HrnSOR* zugänglich sein könnte, wurde ausgehend vom Mittelpunkt der inneren Kavität eine Analyse mit MOLE durchgeführt und nach Verbindungen zur Enzymoberfläche gesucht (Abb. 66).

Bei der Analyse wurden 32 potentielle Kanäle identifiziert, über die die zentrale innere Kavität mit der Enzymoberfläche in Verbindung steht. Aus den Austrittspunkten all dieser Kanäle lassen sich drei unterschiedlichen Poren differenzieren. Austrittspunkt 1 stellte den bereits zuvor beschriebenen Trimerkanal dar, der aufgrund des geringen Porendurchmessers und der geringen

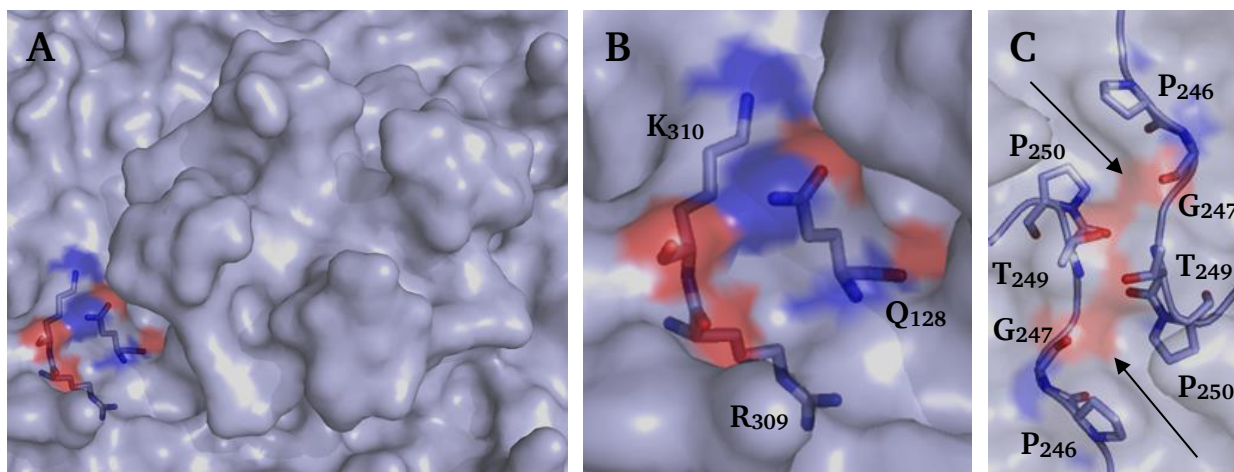
Flexibilität der porenbildenden Aminosäuren vermutlich keine ausreichende Größe für die Substrat- oder Produktpassage bietet. Der durchschnittliche Porendurchmesser aller 6 Trimerkanäle in dieser Analyse betrug 1,35 Å (min. 1,22 Å / max. 1,48 Å). Austrittspunkt 2 ist unmittelbar an der Basis der Tetramerkanäle lokalisiert und über einen langen Kanal mit der inneren Kavität verbunden.



**Abbildung 66:** (A) Überlagerung aller potentiellen Kanäle, die ausgehend vom Mittelpunkt der inneren Kavität mit der Enzymoberfläche in Verbindung stehen könnten. (B) Oberflächendarstellung des *HrsOR*-Holoenzym mit den Austrittspunkten der identifizierten Kanäle (pink). Es wurden drei unterschiedliche Austrittspunkte differenziert. (1) Trimerkanal, (2) Austrittspunkt nahe des Tetramerkanals am C-Terminus der Untereinheit, (3) Austrittspunkt exakt in der Grenzregion zweier Untereinheiten.

Der mittlere Durchmesser der 21 an der Oberfläche identifizierten Poren von Austrittspunkt 2 beträgt 2,32 Å (min. 1,90 Å / max. 2,74 Å). Diese Pore wird von den Seitenketten der Aminosäuren Q<sub>128</sub>, R<sub>309</sub> und K<sub>310</sub> gebildet (Abb. 67 A+B). Dieser Austrittspunkt wurde nur in 21 von 24 Untereinheiten erkannt, was darauf hindeutet, dass der Porendurchmesser bei drei Untereinheiten zu gering war, um als Pore erkannt zu werden. Austrittspunkt 3 befindet sich an der Schnittstelle zweier Untereinheiten und wird von den Aminosäuren P<sub>246</sub>, G<sub>247</sub>, T<sub>249</sub> und P<sub>250</sub> gebildet. Insgesamt existieren 12 dieser Schnittstellen in der SOR, wobei sich an jeder Schnittstelle zwei der potentiellen Poren gegenüberliegen (Abb. 67 C). Jedoch wurden nur fünf der 24 möglichen Austrittspunkte bei der Analyse mit MOLE nachgewiesen. Der mittlere Durchmesser der Poren beträgt 1,96 Å (min. 1,68 Å / max. 2,34 Å). Keine der beschriebenen Poren ist in der Oberflächendarstellung des Enzyms als solche erkennbar. Auch zeigen die Ergebnisse, dass die Porendurchmesser keineswegs an allen entsprechenden Stellen des Enzyms identisch sind, sondern teilweise beträchtliche Unterschiede von bis zu 0,84 Å aufweisen.





**Abbildung 67:** Neu identifizierte Poren an der Oberfläche der *HnSOR*. (A) Austrittspunkt an der Basis eines Tetramerkans mit *stick*-Darstellung der an der Porenbildung beteiligten Aminosäuren. (B) Nahansicht des Austrittspunktes an der Basis eines Tetramerkans. (C) Austrittspunkte an der Schnittstelle zweier Untereinheiten mit *stick*-Darstellung der an der Porenbildung beteiligten Aminosäuren. Die Porenöffnungen sind durch Pfeile markiert. Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome blau gefärbt.

Neben den bereits bekannten Tetramer- und Trimerkanälen wurden somit noch zwei weitere potentielle Kanäle in der *HnSOR* identifiziert, die aufgrund der größeren Porendurchmesser als alternative Substrat- und Produktwege in Betracht gezogen werden müssen. Die Pore an der Basis der schornsteinähnlichen Strukturen scheint jedoch aufgrund ihrer Größe und der höheren Anzahl an Identifikationen im Holoenzym die wahrscheinlichste Variante zu sein. Dass der Tetramerkanal tatsächlich als Kanal für lineare Schwefelspezies fungiert, konnte experimentell weder eindeutig bestätigt, noch ausgeschlossen werden. Der Trimerkanal scheint jedoch aufgrund des geringen Porendurchmessers und der geringen Flexibilität der beteiligten Aminosäuren nicht als Pore geeignet zu sein. Um diese Fragestellungen eindeutig klären zu können, müssten in weiterführenden Arbeiten Molekuldynamik-Simulationen durchgeführt werden, die auch Konformationsänderungen bei erhöhten Temperaturen unter Reaktionsbedingungen in die Analyse einbeziehen. Daneben stellen die beiden neu identifizierten Poren interessante Ausgangspunkte für Mutagenesestudien dar.

### 7.3.3. Das aktive Zentrum der *HnSOR*

Das aktive Zentrum der *HnSOR* besteht aus einem mononukleären Eisenatom, das von zwei Histidin-Seitenketten (H<sub>88</sub> und H<sub>92</sub>) und einem Glutamat-Rest (E<sub>116</sub>) als zweizähnigem Liganden koordiniert wird. Dieses als 2-His-1-Carboxylat-Triade bekannte Strukturmotiv ist in allen bekannten SOR-Sequenzen hochkonserviert. Die primäre Koordinationssphäre des Eisenzentrums wird dabei durch zwei Wassermoleküle komplettiert und entspricht folglich der Koordination des mononukleären Eisenatoms in der *AaSOR*. Das in der früheren *HnSOR*-Kristallstruktur

---

beobachtete einzelne Wassermolekül in der primären Koordinationssphäre beruhte auf der geringen Auflösung des damaligen *HnSOR*-Datensatzes. Die Analyse der Koordinationsdistanzen ergab, dass die Abstände zwischen Eisenatom und den Liganden in der *HnSOR* etwas größer sind als bei der *AaSOR*. Die Differenzen der Bindungslängen variierten dabei zwischen 0,01 - 0,36 Å. Die Belegungsdichte des Eisenzentrums betrug 0,5. Damit waren 50 % der Untereinheiten mit einem Eisenatom besetzt. Dies steht im Widerspruch zum biochemisch ermittelten Eisengehalt von 1,4 Eisenatome/Untereinheit bei der zur Kristallisation eingesetzten *HnSOR*-Präparation. Vermutlich ist die überstöchiometrische Beladung der *HnSOR* auf eine unspezifische Bindung von Eisen an das Enzym zurückzuführen. Eine solche unspezifische Verteilung der Metallionen wird in der Kristallstruktur, die eine regelmäßige, geordnete Anordnung der Moleküle im Kristall voraussetzt, nicht erfasst.

Neben dem mononukleären Eisenzentrum sind im aktiven Zentrum der *HnSOR*, wie auch bei der *AaSOR*, drei konservierte Cysteine lokalisiert. Am  $\gamma$ -Schwefelatom von C<sub>33</sub> wurde eine zusätzliche Elektronendichte festgestellt, was auf eine Persulfurierung des Cysteins hindeutet, wie sie bereits für C<sub>31</sub> bei der *AaSOR* beobachtet wurde. Während dieser hitzeinduzierte Autosulfurierungsprozess bei der *AaSOR* hohe Temperaturen erfordert, scheint dieser bei der *HnSOR* bei moderaten Temperaturen abzulaufen (Veith, 2011a). Neben dieser strukturellen Übereinstimmung mit der *AaSOR* wurde jedoch in der neuen Kristallstruktur auch eine zusätzliche Elektronendichte an den  $\gamma$ -Schwefelatomen der beiden konservierten Cysteine C<sub>103</sub> und C<sub>106</sub> beobachtet und als Persulfurierung interpretiert. Diese Modifikation der beiden Cysteine war bislang weder in der vorangegangenen *HnSOR*-Kristallstruktur, noch in einem der zahlreichen *AaSOR*-Datensätzen beobachtet worden. Die Orientierung der terminalen  $\delta$ -Schwefelatome von CSS<sub>103</sub> und CSS<sub>106</sub> variiert dabei in den 24 kristallographisch unabhängigen Untereinheiten. Bei 13 Untereinheiten betrug der Abstand der beiden terminalen  $\delta$ -Schwefelatome von CSS<sub>103</sub> und CSS<sub>106</sub> im Mittel lediglich 2,0 Å. Ein vergleichbarer Abstand wurde bereits bei der kovalenten Bindung zwischen dem  $\gamma$ - und  $\delta$ -Schwefelatom von CSS<sub>33</sub> mit 2,02 Å ermittelt. Dies legt nahe, dass zwischen den  $\delta$ -Schwefelatomen von CSS<sub>103</sub> und CSS<sub>104</sub> eine kovalente Bindung besteht und sie damit über eine Tetrasulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Ein in der Schwefeloxidation vorkommendes Enzym mit vergleichbarer Charakteristik ist die Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (SQR). SQRs katalysieren die Oxidation von Schwefelwasserstoff zu elementarem Schwefel. Eine Triade aus drei essentiellen Cysteinen bildet das aktive Zentrum zusammen mit dem Cofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). Zwischen zwei dieser Cysteine wird eine initiale redoxaktive Disulfidbrücke ausgebildet. Nach der Katalyse liegt der Cofaktor FAD in reduzierter Form vor und ein Sulfid-Ion wurde zu elementarem Schwefel oxidiert und in eine Polysulfidkette eingebaut, die mit einem oder zwei katalytischen Cysteinen verbunden ist (Cherney *et al.*, 2012; Brito 2009). Trotz einiger



Gemeinsamkeiten zwischen SOR und SQR, wie etwa die Beteiligung von drei Cysteinen und einer Polysulfidbrücke an der Katalyse, unterscheidet sich die SQR doch fundamental von der SOR durch deren Abhängigkeit von einem Cofaktor. Daher können keine direkten Verbindungen zwischen den Reaktionstypen von SOR und SQR abgeleitet werden. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass aufgrund der strengen Konservierung der drei Cysteine in allen SOR-Sequenzen die bei der *HnSOR* beobachtete Polysulfidbrücke auch bei den anderen SOR-Spezies auftritt und die Katalyse beeinflusst. Deren genaue Funktion bleibt aber ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die sekundäre Koordinationssphäre der *HnSOR* wird durch die Seitenkette von Y<sub>118</sub> gebildet. Mit einem mittleren Abstand von 2,68 Å befindet sich die Hydroxylgruppe der Tyrosin-Seitenkette in einer geeigneten Distanz zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem  $\delta$ 1-Stickstoffatom von H<sub>88</sub> (Abb. 62). Folglich unterscheidet sich die sekundäre Koordinationssphäre deutlich von der *AaSOR*. Dort wird sie von E<sub>87</sub> ausgebildet. Die Sauerstoffatome der hierzu homologen Aminosäure E<sub>89</sub> befinden sich in der *HnSOR* hingegen mit einem Abstand von rund 4,2 Å in einer zu großen Entfernung zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Anstelle von Y<sub>118</sub> befindet sich in der *AaSOR* ein Isoleucin (I<sub>116</sub>), das aufgrund der fehlenden Polarität nicht zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen geeignet ist. Die direkt danebengelegene Tyrosin-Seitenkette (Y<sub>117</sub>) kann wegen der zu großen räumlichen Distanz und der unterschiedlichen Orientierung keine Wasserstoffbrückenbindung mit einem der Eisenliganden ausbilden (Abb. 63). Somit wird die sekundäre Koordinationssphäre in *HnSOR* und *AaSOR* jeweils von einer einzigen Aminosäure gebildet, die die primäre Koordinationssphäre des Eisenatoms direkt beeinflusst. Sie unterscheiden sich lediglich in ihrer Lokalisierung. So befindet sich E<sub>87</sub> der *AaSOR* in der gleichen  $\alpha$ -Helix wie die beiden an der Eisenkoordination beteiligten Histidine (H<sub>86</sub> und H<sub>90</sub>). Y<sub>118</sub> der *HnSOR* ist dagegen auf dem gleichen  $\beta$ -Faltblatt lokalisiert wie der zweizählige Eisenligand E<sub>116</sub>. Ob die unterschiedlichen maximalen Enzymaktivitäten von *HnSOR* und *AaSOR* möglicherweise mit den beiden verschiedenen sekundären Koordinationssphären zusammenhängen, ist ungewiss. Mutagenesestudien mit der *AaSOR* haben ergeben, dass eine Substitution von E<sub>87</sub> gegen Alanin, und somit die Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindung zur primären Koordinationssphäre, eine deutliche Reduktion der enzymatischen Aktivität bewirkt (Kapitel 9, Veith, 2011a). Unklar ist bislang, in welcher Art die sekundäre Koordinationssphäre der SOR die Enzymaktivität beeinflusst. Denkbar wäre eine Beeinflussung des Redoxpotentials, wie es bereits anhand der sekundären Koordinationssphäre der Superoxiddismutase von *E. coli* demonstriert wurde (Miller, 2007). Ob die sekundäre Koordinationssphäre der *HnSOR* einen ähnlich starken Einfluss auf die Enzymaktivität ausübt, ist bislang rein spekulativ. Versuche, Y<sub>118</sub> via Mutagenese zu substituieren und so die Wasserstoffbrückenbindung zu H<sub>88</sub> zu entfernen, lieferten keine ausreichenden Proteinmengen zur Quantifizierung der enzymatischen Aktivität

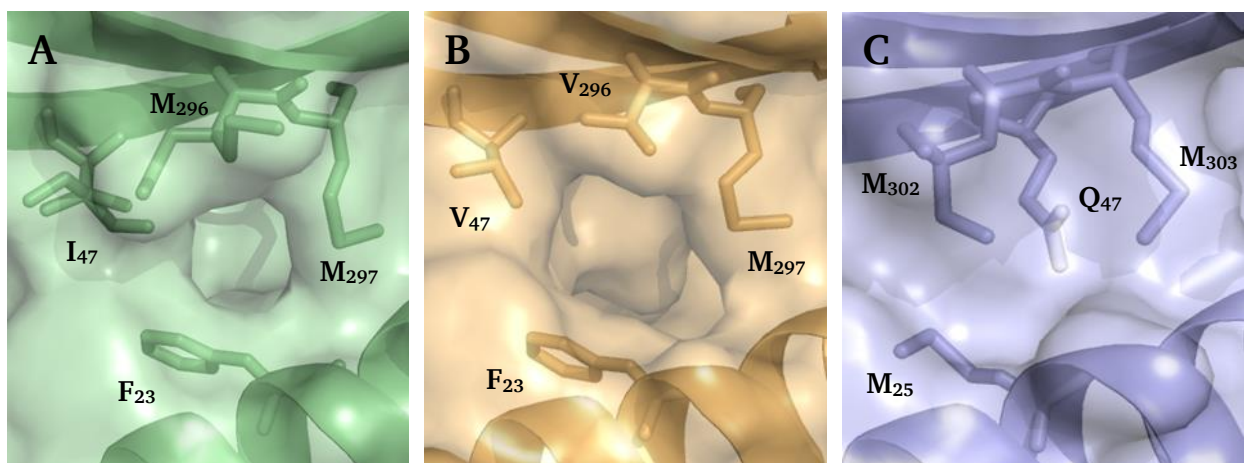
---

(siehe Kapitel 9). Werden diese geringen Ausbeuten als eine Destabilisierung des Enzyms durch Einbringung der entsprechenden Mutation bewertet, könnte dies wiederum auf eine wichtige Funktion von Y<sub>118</sub> bei der Stabilisierung des Enzyms hinweisen. Neben der Wasserstoffbrückenbindung zu H<sub>88</sub> befindet sich die Hydroxylgruppe von Y<sub>118</sub> in geeigneter Distanz zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zum ε2-Sauerstoff von E<sub>89</sub> und ist Teil eines möglichen Wasserstoffbrückennetzwerks innerhalb der aktiven Tasche. Dieses potentielle Wasserstoffbrückennetzwerk erstreckt sich bei der *HnSOR* über einen weiteren Bereich der aktiven Tasche als das für die *AaSOR* postulierte Wasserstoffbrückennetzwerk. Es ist daher denkbar, dass dieses putative Netzwerk nicht nur Einfluss auf die primäre Koordinationssphäre der *HnSOR* nehmen könnte, sondern auch zur Stabilität des Enzyms beiträgt. Die Tatsache, dass auch die Mutagenese von E<sub>89</sub> erfolglos verlief und trotz mehrmaliger Proteinpräparation keine ausreichenden Enzymmengen isoliert werden konnten (Kap. 9), unterstützt diese These. E<sub>89</sub> stellt den Mittelpunkt des putativen Wasserstoffbrückennetzwerkes dar und steht in direktem Kontakt mit Y<sub>118</sub>, S<sub>205</sub> und drei Wassermolekülen, die wiederum über Wasserstoffbrückenbindungen mit fünf weiteren Aminosäuren in Verbindung stehen. Somit könnte die verglichen mit der *AaSOR* geringere Anzahl an internen Salzbrücken teilweise durch ein größeres Wasserstoffbrückennetzwerk kompensiert werden. Die Zerstörung des Wasserstoffbrückennetzwerkes durch Substitution einer der zentralen Aminosäure würde somit zur Destabilisierung des Enzyms beitragen und den Misserfolg der Proteinproduktionen erklären. Die Existenz und der mögliche Einfluss des putativen Wasserstoffbrückennetzwerkes auf die Katalyse und die Proteinstabilität wurden bislang jedoch nicht verifiziert. Die Beobachtung, dass die entsprechenden Wassermoleküle innerhalb des postulierten Wasserstoffbrückennetzwerkes in geordneten Strukturen auftreten, also in fast allen kristallographisch unabhängigen Untereinheiten an der gleichen Position lokalisiert sind, weist aber auf die Existenz der beschriebenen Wechselwirkung in der aktiven Tasche der *HnSOR* hin.

## 8. Mutationsanalysen der Zugangsporen zum aktiven Zentrum

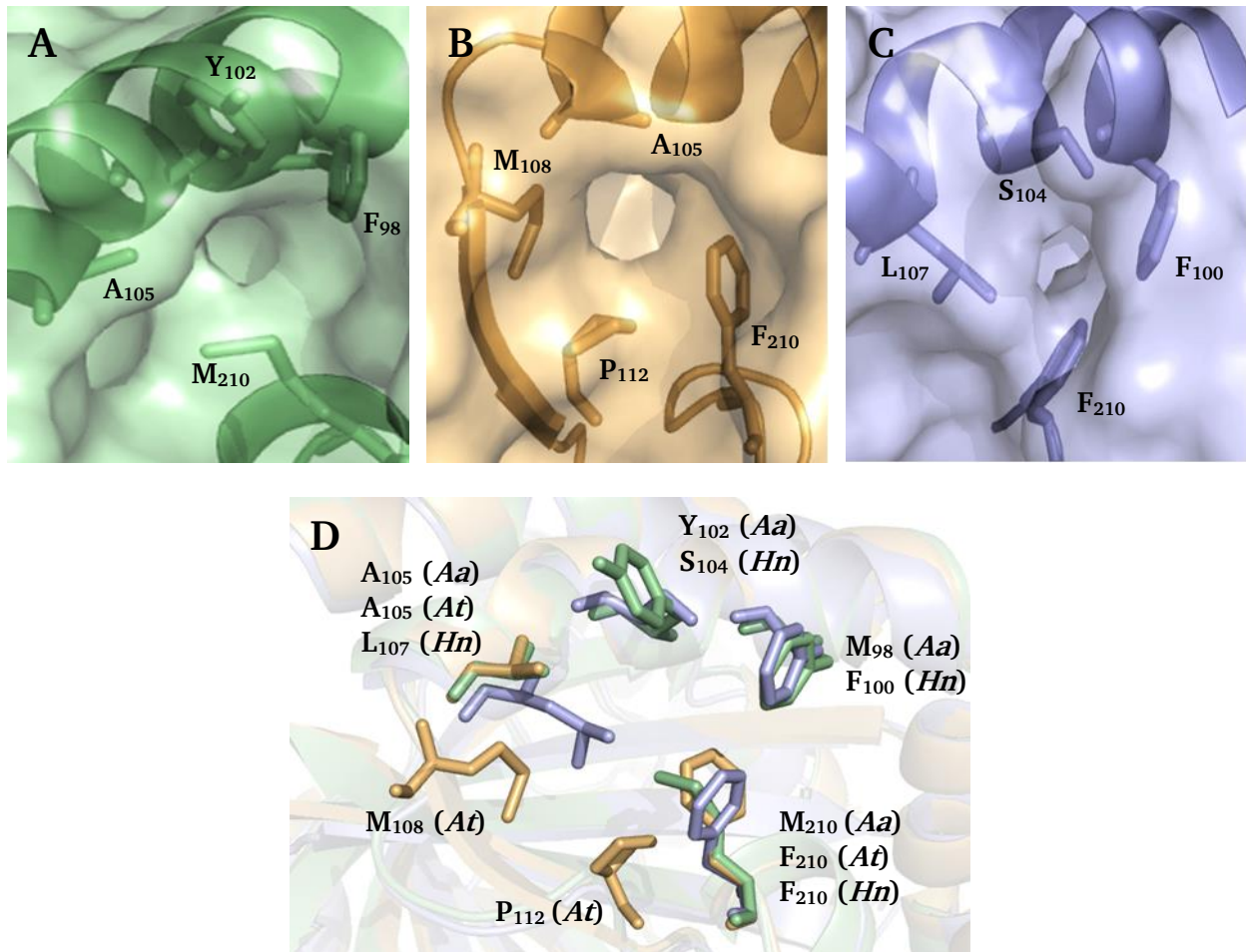
### 8.1. Einleitung

Die aktiven Zentren der SORs stehen über Poren mit der zentralen inneren Kavität des Enzyms in Verbindung und sind so für das Substrat zugänglich. Die Eingangspore der AaSOR wird von den hydrophoben Aminosäuren F<sub>23</sub>, I<sub>47</sub>, M<sub>296</sub> und M<sub>297</sub> gebildet (Abb. 68 A; Veith, 2011a; Urich *et al.*, 2006). Die Eingangspore der AtSOR (Accession PDB: 3BXV) ist in der Kristallstruktur an der gleichen Position lokalisiert und wird von F<sub>23</sub>, V<sub>47</sub>, V<sub>296</sub> und M<sub>297</sub> gebildet (Abb. 68 B). Erste Untersuchungen der putativen Eingangspore zum aktiven Zentrum der HnSOR in der früheren Kristallstruktur (Veith, 2011a) hatten darauf hingedeutet, dass eine Verbindung zwischen der zentralen inneren Kavität des Enzyms und der aktiven Taschen durch die Aminosäure Q<sub>47</sub> verhindert wird (Abb. 68 C; Kap 7).



**Abbildung 68:** Eingangsporen zum aktiven Zentrum von AaSOR (A) und AtSOR (B) sowie die entsprechende Position in der HnSOR (C). Die Aufnahmen basieren auf den Kristallstrukturen der jeweiligen Holoenzyme.

Bereits in der ersten verfügbaren Kristallstruktur der HnSOR wurde eine Pore am anderen Ende der aktiven Tasche gefunden, die in Verbindung mit dem Inneren des Enzyms steht und nahe des Trimerkanals lokalisiert ist. Sie wird aus den Aminosäuren F<sub>100</sub>, S<sub>104</sub>, L<sub>107</sub> und F<sub>210</sub> gebildet (Abb. 69 C; Veith, 2011a). Eine entsprechende Pore war zuvor in den Monomeren der AtSOR identifiziert worden, die von den Aminosäuren A<sub>105</sub>, M<sub>108</sub>, P<sub>112</sub> und M<sub>210</sub> gebildet wird (Abb. 69 B; Li *et al.*, 2008). In der AaSOR war eine entsprechende Pore nicht sichtbar (Veith, 2011a). Betrachtet man jedoch nicht das Holoenzym, sondern lediglich ein einzelnes Monomer wie bei der AtSOR, so lässt sich auch in der Kristallstruktur der AaSOR diese Öffnung erkennen (Abb. 69 A). Die Überlagerung aller drei Monomere verdeutlicht, dass diese Poren von AaSOR und HnSOR in etwa an der gleichen Position der Untereinheit lokalisiert sind, wohingegen die Pore der AtSOR geringfügig verschoben vorliegt (Abb. 69 D).



**Abbildung 69:** Mögliche Ausgangsporen aus dem aktive Zentrum von *AaS*OR (A), *AtS*OR (B) und *HnS*OR (C). Die Aufnahmen basieren auf den Monomeren der jeweiligen Kristallstrukturen. (D) Überlagerung der Monomere von *AaS*OR (grün), *AtS*OR (orange) und *HnS*OR mit den an der Bildung der Ausgangsporen beteiligten Aminosäuren.

Während die Pore in der *HnS*OR auch im Holoenzym deutlich zu erkennen ist, wird sie bei der graphischen Darstellung von *AaS*OR und *AtS*OR nicht sichtbar. Sie scheinen durch die Interaktionsfläche mit der benachbarten Untereinheit verschlossen zu werden. Somit ist visuell nur ein Zugang zum aktiven Zentrum in jedem der drei Enzyme erkennbar, bei *AaS*OR und *AtS*OR über den als Eingangspore beschriebenen Zugang und bei der *HnS*OR über die als Ausgangspore beschriebene Öffnung.

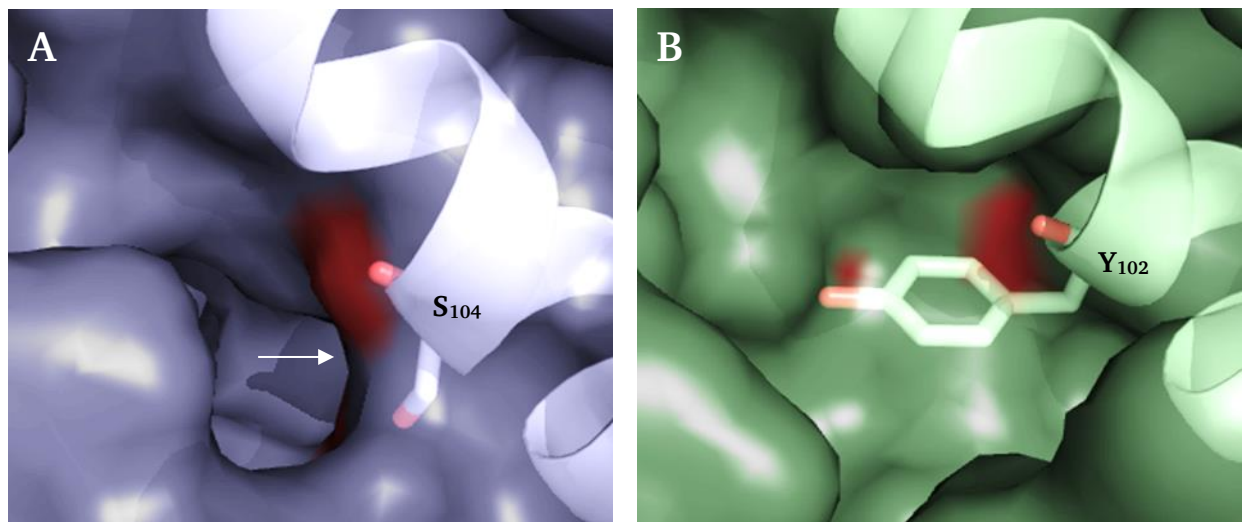
Der am Beispiel der *HnS*OR postulierte Substrat- und Produktweg basiert auf dem Eintritt des Substrats durch die nicht eindeutig erkennbare Eingangspore und dem Austritt der Produkte durch die Ausgangspore (Abb. 48; Veith, 2011a). Da bei der *AaS*OR keine solche Ausgangspore im Holoenzym sichtbar ist, wurde versucht, durch ortsspezifische Mutagenese einen solchen Ausgang aus dem aktiven Zentrum zu erzeugen und den für die *HnS*OR vorgeschlagenen Weg von Substrat und Produkten zu reproduzieren. Hierbei wurde im Vorfeld nach geeigneten Aminosäuresubstitutionen gesucht, die im Modell einen solchen Zugang gewährleisten. Für eine bessere Interpretation der Resultate sollte zusätzlich die Eingangspore der *AaS*OR durch geeignete



Mutationen verschlossen werden. Analog zu diesen Mutationen wurden auch erstmals Aminosäuresubstitutionen in der *HnSOR* vorgenommen, mit dem Ziel, die Ein- und Ausgangspore durch geeignete Substitutionen zu öffnen bzw. zu verschließen. Die strukturellen Auswirkungen sollten weiterführend durch Röntgenstrukturanalysen bestätigt werden.<sup>2</sup>

## 8.2. Ergebnisse

Untersuchungen der Ausgangspore zeigten, dass das in der *AaSOR* an Position 102 lokalisierte Tyrosin aufgrund seiner Größe eine direkte Verbindung mit der inneren Kavität des Holoenzym verhindert (Abb. 70 B). Bei der *HnSOR* hingegen befindet sich an gleicher Position ein Serin ( $S_{104}$ ), das deutlich weniger Raum einnimmt und trotz angrenzender Nachbaruntereinheit eine Verbindung mit der inneren Kavität zulässt. Die Pore ist dabei über einen kleinen Kanal zugänglich (Abb. 70 A).

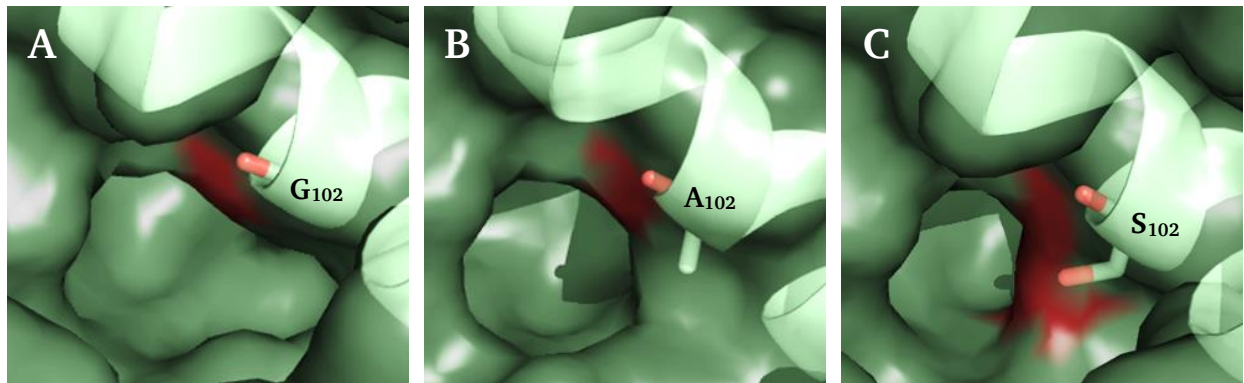


**Abbildung 70:** Zugangschanal zur Ausgangspore in der *HnSOR* (A) und die entsprechende Position in der *AaSOR* (B). In der *AaSOR* ist der Zugang zur Pore aufgrund der großen Tyrosin-Seitenkette blockiert, wohingegen die kleinere Serin-Seitenkette der *HnSOR* einen Zugang über einen kleinen Kanal ermöglicht. Die eigentliche Ausgangspore befindet sich in der rechten Seitenwand des Zugangschanals (weißer Pfeil). Bei der *AaSOR* ist die Pore wegen des großen  $Y_{102}$  nicht über einen solchen Zugang erreichbar.

Um die Ausgangspore auch in der *AaSOR* mit der inneren Kavität des Enzyms zu verbinden, wurde  $Y_{102}$  durch andere Aminosäuren substituiert. Die Auswirkungen der entsprechenden Mutationen wurden im Vorfeld mit Hilfe des SWISS-MODEL-Servers (Arnold *et al.*, 2006) durch

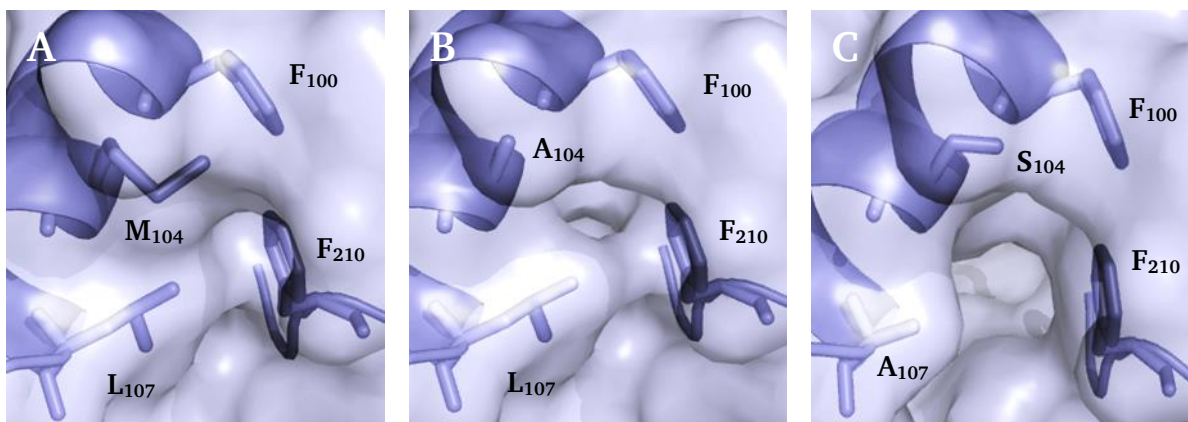
<sup>2</sup>Zum Durchführungszeitpunkt der beschriebenen Experimente war die in Kap. 7 charakterisierte, hochauflösende Kristallstruktur der *HnSOR* noch nicht verfügbar und die neu identifizierte Eingangspore zum aktiven Zentrum unbekannt. Auch wurden zum damaligen Zeitpunkt noch keine systematischen Analysen von Poren und Kanälen in einer der SORs mittels CAVER oder MOLE durchgeführt. Daher wurden alle Modellierungen und Mutationen auf Basis des damaligen Kenntnisstandes und der vorläufigen Kristallstruktur der *HnSOR* vorgenommen.

Konstruktion von 3D-Modellen überprüft. Zur Öffnung des Zugangs stellten sich dabei die Substitutionen von Y<sub>102</sub> gegen Glycin, Alanin und dem in der *HnSOR* an gleicher Stelle lokalisierten Serin als geeignet heraus. All diese Substitutionen wiesen in der Strukturvorhersage einen mit der *HnSOR* vergleichbaren Zugang auf, über den die Ausgangspore der aktiven Tasche von der inneren Kavität aus zugänglich wird (Abb. 71). Als weitere Mutante wurde Y<sub>102</sub>W gewählt, um den Durchgang endgültig zu verschließen.



**Abbildung 71:** Modellierte 3D-Strukturen der Y<sub>102</sub>-Mutanten Y<sub>102</sub>G (A), Y<sub>102</sub>A (B) und Y<sub>102</sub>S (C). Alle Mutanten zeigen einen deutlichen Zugangskanal, über den die putative Ausgangspore von der inneren Kavität des Enzyms aus zugänglich ist.

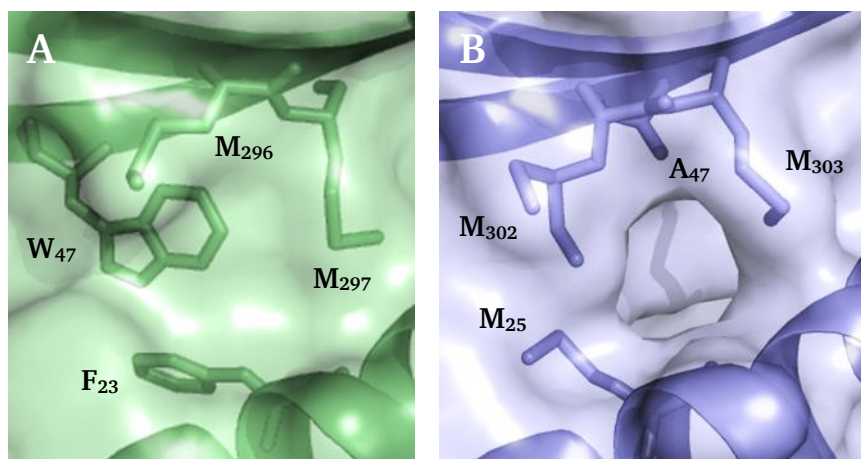
Zur weiteren Unterstützung der Analysen wurden Mutationen in die *HnSOR* eingebracht. Hierbei wurde versucht, die Ausgangspore durch Substitutionen gegen größere Aminosäuren zu verschließen und durch Substitutionen gegen kleinere Aminosäuren die Pore zu erweitern. Die Modellierungen des SWISS-MODEL-Servers zeigten, dass die porenbildenden Aminosäuren S<sub>104</sub> und L<sub>107</sub> geeignete Ziele für diese Mutationen darstellen. Ein Verschluss der Pore konnte im Modell durch Substitution von S<sub>104</sub> gegen Methionin erzielt werden. Zur Vergrößerung der Pore wurden die Aminosäuren S<sub>104</sub> und L<sub>107</sub> gegen Alanin ausgetauscht (Abb. 72).



**Abbildung 72:** Modellierte 3D-Strukturen der *HnSOR*-Porenmutanten S<sub>104</sub>M (A) zum Schließen und S<sub>104</sub>A (B) sowie L<sub>107</sub>A (C) zum Vergrößern der Ausgangspore.



Neben den Mutationen an der potentiellen Ausgangspore der SORs wurden zur besseren Interpretation der Resultate auch Aminosäuresubstitutionen an der Eingangspore vorgenommen. Zum Verschluss der Eingangspore in der *AaSOR* wurde im Modell die Substitution I<sub>47</sub>W als geeignet vorhergesagt, wohingegen die Mutante Q<sub>47</sub>A selbige in der *HnSOR* öffnen sollte (Abb. 73).



**Abbildung 73:** Modellierte 3D-Strukturen der Porenmutanten I<sub>47</sub>W zum Verschluss der Eingangspore in der *AaSOR* (A) und Q<sub>47</sub>A in der *HnSOR* zum Öffnen dieser Pore (B).

Zur Konstruktion der Mutanten wurden die beiden Vektoren pASK-sor.05 und pASK\_ *HnSOR*, welche die Wildtyp-Sequenz des jeweiligen *sor*-Gens tragen, durch ortsspezifische Mutagenese verändert (siehe 3.2.1 und 3.2.3).

**Tabelle 26:** Übersicht der Porenmutanten von *AaSOR* und *HnSOR* sowie die erwarteten Auswirkungen der eingebrachten Mutationen.

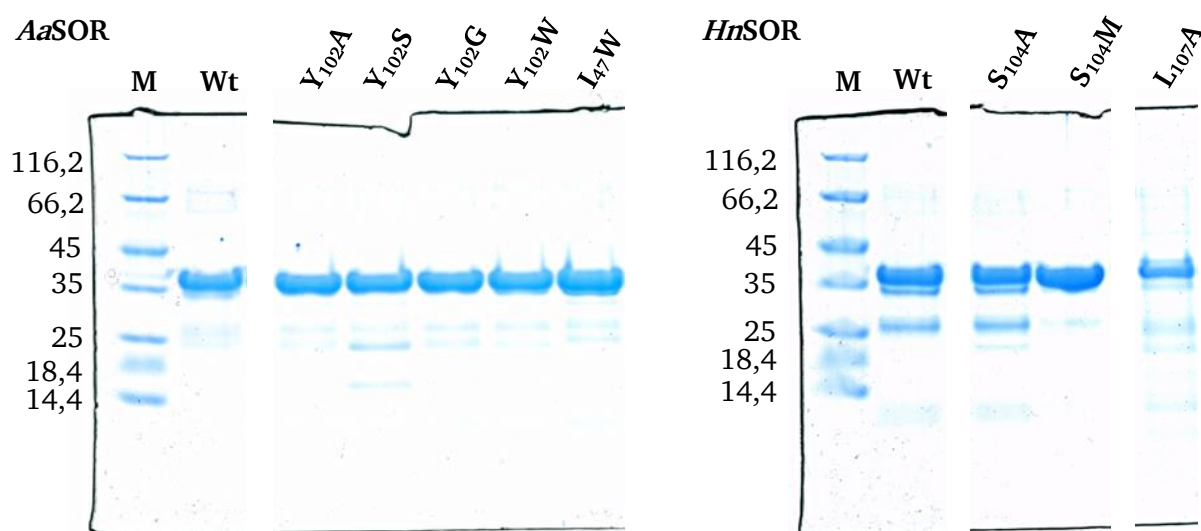
<i>AaSOR</i>	Erwarteter Effekt	<i>HnSOR</i>	Erwarteter Effekt
Y <sub>102</sub> A Y <sub>102</sub> G Y <sub>102</sub> S	Erzeugung eines Verbindungskanals zwischen innerer Kavität und Ausgangspore	S <sub>104</sub> M	Verschluss der Ausgangspore analog zur <i>AaSOR</i>
Y <sub>102</sub> W	Zusätzliche Blockade der Ausgangspore	S <sub>104</sub> A L <sub>107</sub> A	Vergrößerung der Ausgangspore
I <sub>47</sub> W	Verschluss der Eingangspore analog zur <i>HnSOR</i>	Q <sub>47</sub> A	Öffnung der Eingangspore analog zur <i>AaSOR</i>

Die Proteinausbeuten der *AaSOR*-Mutanten lagen zwischen 0,40 bis 4,37 mg Protein/500 mL Kulturmedium und für die *HnSOR*-Mutanten zwischen 0,42 und 3,06 mg Protein/500 mL Kulturmedium (Tab. 27).

**Tabelle 27:** Übersicht der gereinigten SOR-Mutanten mit der Spanne der erzielten Proteinausbeuten und dem mittleren relativen Eisengehalt aller Präparationen.

Mutante	Proteinausbeuten (mg/500 mL Medium)	Relativer Eisengehalt (nmol Fe/nmol Enzym)
<i>AaSOR</i> Y <sub>102</sub> A	1,24 – 3,74	0,63 ± 0,08
<i>AaSOR</i> Y <sub>102</sub> G	0,67 – 3,75	0,79 ± 0,18
<i>AaSOR</i> Y <sub>102</sub> S	0,99 – 3,48	0,60 ± 0,10
<i>AaSOR</i> Y <sub>102</sub> W	1,07 – 4,37	0,60 ± 0,10
<i>AaSOR</i> I <sub>47</sub> W	0,4 – 1,74	0,53 ± 0,05
<i>HnSOR</i> S <sub>104</sub> A	1,22 – 2,67	0,90 ± 0,08
<i>HnSOR</i> S <sub>104</sub> M	0,42 – 3,06	0,84 ± 0,12
<i>HnSOR</i> L <sub>107</sub> A	0,43 – 0,70	0,78 ± 0,03
<i>HnSOR</i> Q <sub>47</sub> A	-	-

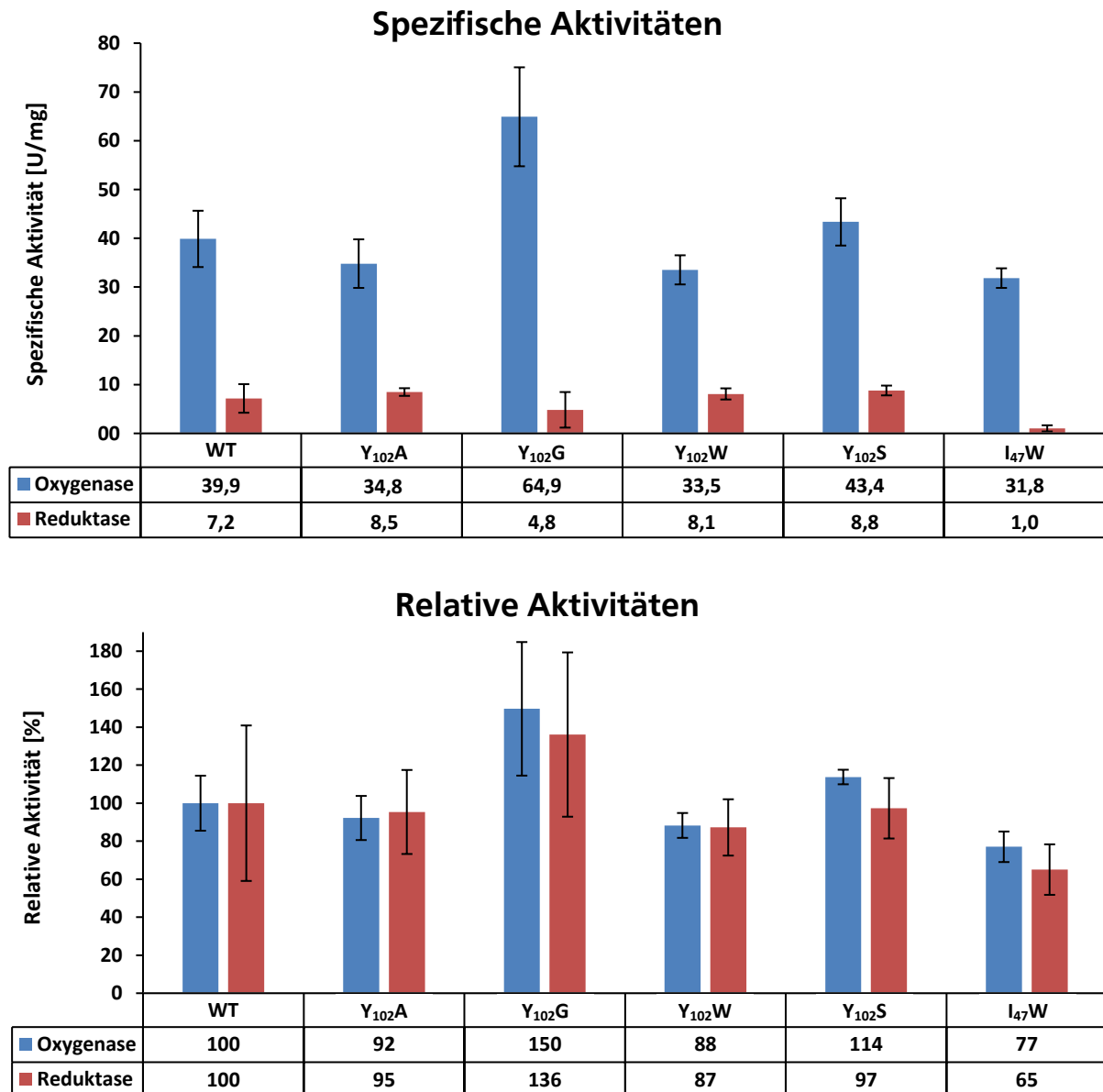
Für die *HnSOR*-Mutante Q<sub>47</sub>A konnte trotz mehrfacher Wiederholung kein rekombinantes Protein isoliert werden. Der mittlere Eisengehalt aller SOR-Mutanten lag oberhalb des gesetzten Mindestwertes von 0,5 nmol Eisen/nmol Enzym (Tab. 27). Alle Porenmutanten zeigten nach der Auftrennung via SDS-PAGE ein mit dem Wildtyp vergleichbares Bandenmuster (Abb. 74).



**Abbildung 74:** Coomassie-gefärbtes 10 % SDS-Gel der Porenmutanten von *AaSOR* und *HnSOR*. **M**, Marker – Korrespondierende Bandengröße in kDa; **Wt**, Wildtyp. 10 µg Protein pro Spur, Marker *unstained*# 26610.

Alle Präparationen umfassten eine breite Bande auf Laufhöhe des Monomers bei rund 36 kDa, zwei schwache Banden bei etwa 66 kDa und einige kleinere Banden, die Abbauprodukte der SOR darstellen (Urich *et al.*, 2004). Die Auswirkungen der entsprechenden Mutationen wurden durch einen Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von Mutanten und Wildtyp untersucht (Abb. 75). Die Ermittlung der relativen Mutanten-Aktivitäten erfolgte stets unter Bezug auf eine zeitgleich

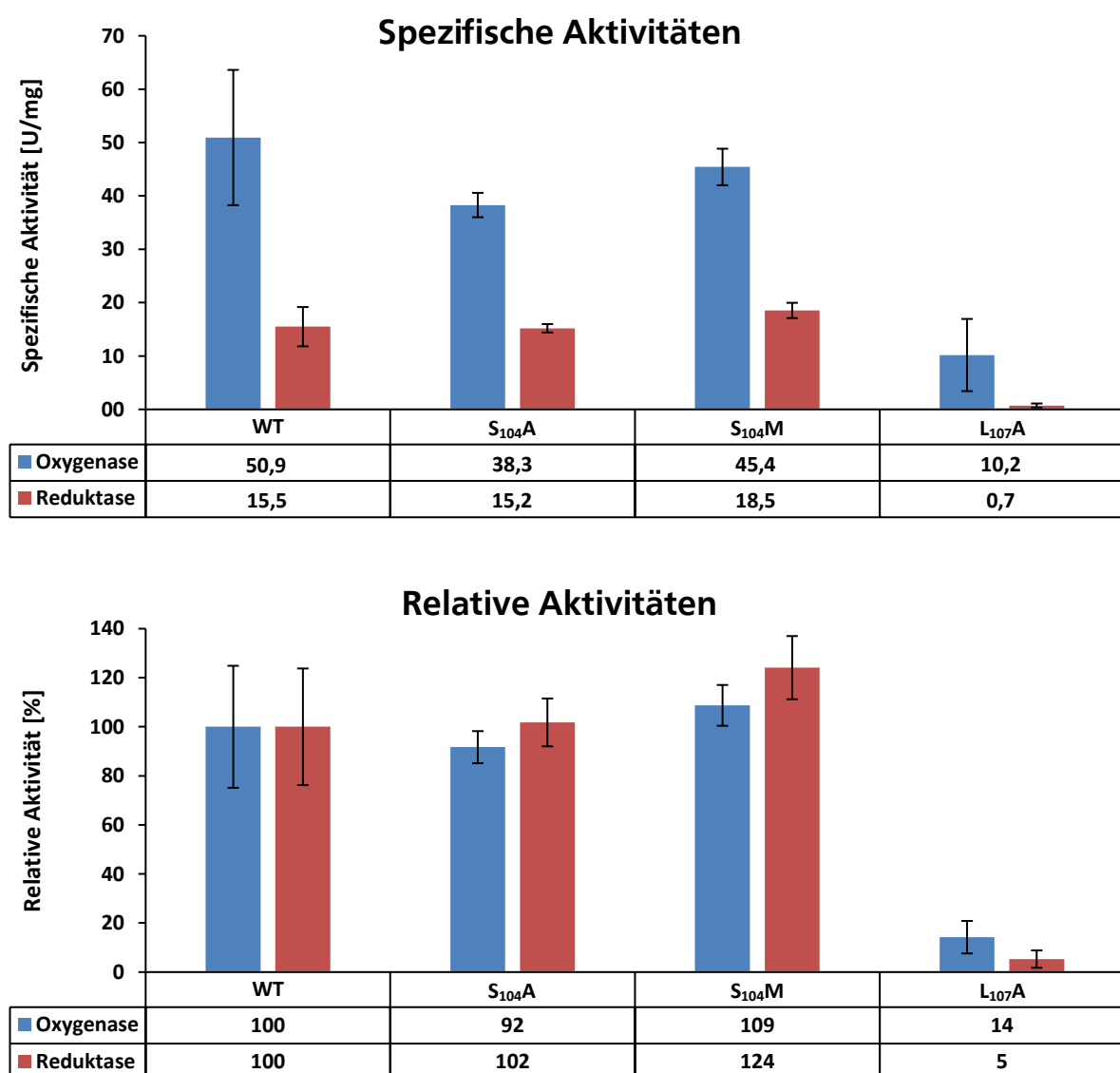
durchgeführte *Aa*SOR/*Hn*SOR-Wt-Aktivitätsbestimmung, um einheitliche Reaktionsbedingungen zu schaffen und die teilweise starken Schwankungen der Aktivitäten unterschiedlicher Wildtyppräparationen zu verringern.



**Abbildung 75:** Spezifische und relative Aktivitäten von *Aa*SOR-WT und *Aa*SOR-Porenmutanten. (■) Oxygenaseaktivität (Thiosulfat + Sulfit), (■) Reduktaseaktivität (H<sub>2</sub>S). Die spezifischen Aktivitäten der Mutanten sind Mittelwerte aus mindestens drei Aktivitätsbestimmungen von zwei unabhängigen Enzympräparationen. Die spezifische Aktivität der *Aa*SOR-WT stellt einen Mittelwert von Aktivitätsbestimmungen verschiedener *Aa*SOR-WT-Enzympräparationen dar. Die aufgeführten relativen Aktivitäten der *Aa*SOR-Porenmutanten beziehen sich nicht auf diesen Mittelwert, sondern auf die spezifische Aktivität einer *Aa*SOR-WT-Präparation, die zeitgleich mit der getesteten Enzymvariante isoliert wurde.

Die durchschnittliche Oxygenaseaktivität betrug für den *Aa*SOR-Wt  $39,9 \pm 5,8$  U/mg und die Reduktaseaktivität  $7,2 \pm 2,9$  U/mg. Mit relativen Oxygenaseaktivitäten von 88 - 114 % bewegten sich die Mutanten Y<sub>102</sub>A, Y<sub>102</sub>S und Y<sub>102</sub>W alle in einem zum *Aa*SOR-Wt vergleichbaren

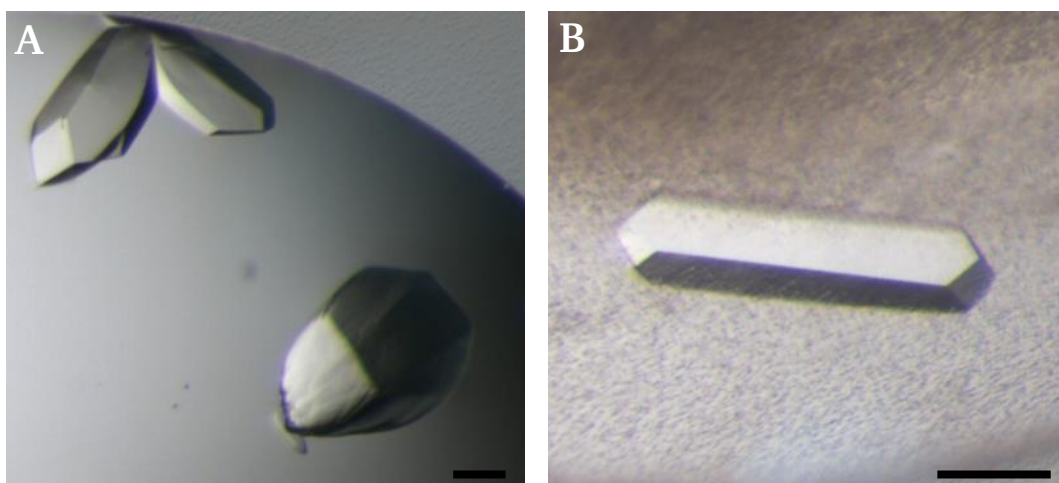
Aktivitätsbereich. Lediglich die Mutante Y<sub>102</sub>G wies mit 64,9 U/mg eine um etwa 50 % höhere Oxygenaseaktivität und eine um ca. 36 % erhöhte Reduktaseaktivität auf. Die Mutante I<sub>47</sub>W wies mit ca. 77 % Oxygenaseaktivität und 65 % Reduktaseaktivität eine leichte Verringerung der enzymatischen Aktivität auf. Die Oxygenase- und Reduktaseaktivitäten der *HnSOR*-Wt betrugen  $50,9 \pm 12,7$  U/mg bzw.  $15,5 \pm 3,7$  U/mg. Die relativen Oxygenaseaktivitäten der Mutanten S<sub>104</sub>A und S<sub>104</sub>M bewegten sich mit 92 und 109 % auf einem ähnlichen Niveau wie der Wildtyp. Auch die relativen Reduktaseaktivitäten unterschieden sich mit 102 bzw. 124 % nur geringfügig. Lediglich bei Mutante L<sub>107</sub>A reduzierte sich die Restaktivität auf 14 % bei der Oxygenaseaktivität und auf 5 % bei der Reduktaseaktivität (Abb. 76).



**Abbildung 76:** Spezifische und relative Aktivitäten von *HnSOR*-WT und *HnSOR*-Porenmutanten. (■) Oxygenase-aktivität (Thiosulfat + Sulfid), (■) Reduktaseaktivität (H<sub>2</sub>S). Die spezifischen Aktivitäten der Mutanten sind Mittelwerte aus mindestens drei Aktivitätsbestimmungen von zwei unabhängigen Enzympräparationen. Die spezifische Aktivität der *HnSOR*-WT stellt einen Mittelwert von Aktivitätsbestimmungen verschiedener *HnSOR*-WT-Enzympräparationen dar. Die aufgeführten relativen Aktivitäten der *HnSOR*-Porenmutanten beziehen sich nicht auf diesen Mittelwert, sondern auf die spezifische Aktivität einer *HnSOR*-WT-Präparation, die zeitgleich mit der getesteten Enzymvariante isoliert wurde.

Um die Resultate der Aktivitätstests besser interpretieren zu können, wurden die Kristallstrukturen zweier AaSOR-Mutationen exemplarisch bestimmt. Anhand der Kristallstruktur sollte die Zuverlässigkeit des durch den SWISS-MODEL-Server generierten 3D-Modells überprüft und auf die Anwesenheit einer zur inneren Kavität geöffneten Ausgangspore untersucht werden. Die Mutante Y<sub>102</sub>G wurde aufgrund der beobachteten Aktivitätssteigerung ausgewählt. Die Mutante I<sub>47</sub>W wurde kristallisiert, um zu prüfen, ob das Enzym trotz geschlossener Eingangspore aktiv ist oder die Aminosäuresubstitution doch nicht den erwarteten Verschluss der Pore bewirkt.

Vor der Kristallisation wurden die Mutante Y<sub>102</sub>G gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert und auf Konzentrationen von 13,2 mg/mL eingestellt. Die Mutante I<sub>47</sub>W präzipitierte nach der Dialyse beim Versuch der Konzentrierung, weshalb die Proteinlösung gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 10 % [v/v] Glycerin dialysiert wurde, um die Stabilität des Enzyms während des Konzentrierungsvorgangs zu erhöhen. Die zur Kristallisation verwendete Endkonzentration betrug 11,0 mg/mL. Mit einem automatisierten Screening wurden geeignete Kristallisationsbedingungen identifiziert und weiter optimiert. Für die finale Kristallisation der Mutante Y<sub>102</sub>G wurde ein 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 4,6 mit 2,0 M Natriumformiat und für die Mutante I<sub>47</sub>W ein 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 4,2 mit 2,0 M Natriumformiat verwendet. Alle Kristallisationen wurden bei 20 °C durchgeführt. Für beide Mutanten wurde eine Kristallbildung bereits nach 24 h beobachtet. Das Kristallwachstum setzte sich für weitere fünf Tage fort, bis bei der Y<sub>102</sub>G-Mutante hexagonale Kristalle mit einer Größe von 0,3 - 0,4 mm entstanden. Die Größe der I<sub>47</sub>W-Kristalle bewegte sich ebenfalls im Bereich von 0,3 - 0,4 mm, wobei deren Morphologie hexagonalen, nadelförmigen, kubischen bis hin zu rundlichen Kristallen entsprach (Abb. 77).



**Abbildung 77:** Kristalle der AaSOR-Mutanten. I<sub>47</sub>W kristallisiert in 0,1 M Natriumacetat pH 4,2 / 2,0 M Natriumformiat (A). Y<sub>102</sub>G kristallisiert in 0,1 M Natriumacetat pH 4,6 / 2,0 M Natriumformiat (B). Die Größenbalken entsprechen 0,1 mm.

Die Kristalle der SOR-Mutanten wurden nach dem Transfer in die entsprechenden kryoprotektiven Lösungen in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Synchrotron-Bestrahlung gelagert. Die kryoprotektiven Lösungen unterschieden sich von den verwendeten Kristallisationslösungen lediglich durch die Zugabe von 35 % [v/v] Glycerin.

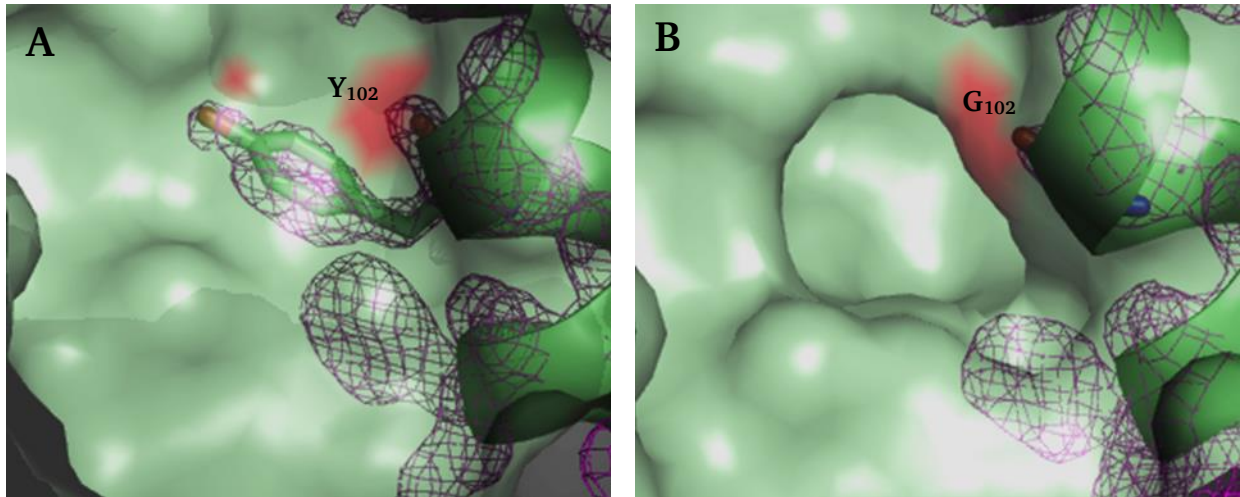
Die Daten der Röntgendiffraktion wurden von Carlos Frazão (ITQB, Oeiras, Portugal) gesammelt. Hierzu wurde die Synchrotronstrahlenquelle I04 der Diamond Light Source (DLS, Oxfordshire, England) mit einer Wellenlänge von 0,9795 Å verwendet. Die Analyse und Bearbeitung der Rohdaten sowie die Erstellung der initialen Kristallstrukturen wurde ebenfalls von Carlos Frazão durchgeführt. Die wichtigsten Diffraktionsdaten, kristallographischen Parameter und Statistiken zum *Refinement* der SOR-Mutanten sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Die Mutante Y<sub>102</sub>G kristallisierte wie die AaSOR-Wt in der Raumgruppe I4 mit tetragonaler, raumzentrierter Elementarzelle mit einer asymmetrischen Einheit von sechs Monomeren. Die Mutante I<sub>47</sub>W hingegen kristallisierte in der Raumgruppe P6<sub>3</sub>22 mit hexagonaler Elementarzelle und einer vier Untereinheiten umfassenden asymmetrischen Einheit.

**Tabelle 28:** Kristallographische Parameter, gesammelte Diffraktionsdaten und Statistiken zum *Refinement* der Kristallstrukturen von Y<sub>102</sub>G und I<sub>47</sub>W. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

Parameter	Y <sub>102</sub> G	I <sub>47</sub> W
Quelle der Röntgenstrahlung	Diamond I04	Diamond I04
Wellenlänge (Å)	0,9795	0,9795
Raumgruppe	I4	P6 <sub>3</sub> 22
Parameter Elementarzelle (Å)	a = b = 161,37 c = 154,1	a = b = 158,16 c = 227,64
Auflösung (Å)	80,68 - 1,95 (2,00 - 1,95)	113,82 - 1,65 (1,69 - 1,65)
Anzahl einzelner Intensitäten	142866	199561
Redundanz	20,41 (20,74)	59,43 (56,83)
I/σ (I)	19,80 (2,02)	29,24 (1,40)
R <sub>meas</sub> (%)	27,3 (179,3)	14,8 (427,2)
R <sub>pim</sub> (%)	4,75 (18,80)	1,57 (13,32)
R <sub>sym</sub> (%)	26,7 (74,9)	14,7 (423,4)
Vollständigkeit (%)	99,9 (99,6)	99,7 (99,4)
Untereinheiten pro asym. Einheit	6	4
Wilson B (Å <sup>2</sup> )	26	27
Struktur nach <i>Refinement</i>	1842 Aminosäuren	1228 Aminosäuren
	1224 Wassermoleküle	1020 Wassermoleküle
	6 Eisenatome	4 Eisenatome
R <sub>work</sub> (%)	16,99	16,28
R <sub>free</sub> (%)	21,26	19,13
Average ADP (Å <sup>2</sup> )	27	33
Bonds RMSD (Å)	0,016	0,007
Angles RMSD (°)	1,053	1,069



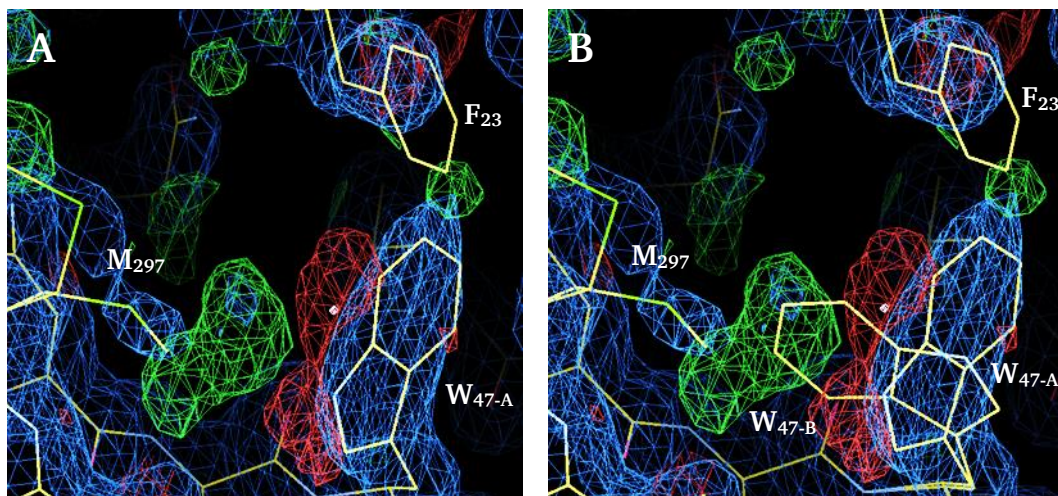
Die Analyse der Elektronendichtekarte der Y<sub>102</sub>G-Kristallstruktur ließ keine weitere Elektronendichte neben dem Aminosäure-*backbone* an Position 102 erkennen und bestätigte damit die erfolgreiche Substitution von Tyrosin gegen Glycin. In der Oberflächendarstellung der Kristallstruktur von Y<sub>102</sub>G ist eine deutliche Öffnung in der Wand der inneren Kavität des Enzyms erkennbar, die eine direkte Verbindung zu den aktiven Zentren in allen Untereinheiten ermöglicht (Abb. 78). Die erzeugte Öffnung in der Y<sub>102</sub>G-Mutante stimmt mit dem generierten Modell des SWISS-MODEL-Servers überein.



**Abbildung 78:** Oberflächendarstellungen der Kristallstrukturen von AaSOR-Wt (A) und der Mutante Y<sub>102</sub>G (B) mit Blick aus der inneren Kavität auf die Aminosäure an Position 102. In der AaSOR-Wt ist der Zugang zur Ausgangspore durch Y<sub>102</sub> versperrt. Die Mutante Y<sub>102</sub>G weist die Substitution von Y<sub>102</sub> gegen Glycin auf und zeigt eine deutliche Öffnung mit Zugang zur aktiven Tasche. Die 2  $F_o-F_c$  Elektronendichtekarten sind mit einem Konturierungslevel von 1,0  $\sigma$  als magentafarbene Netze abgebildet.

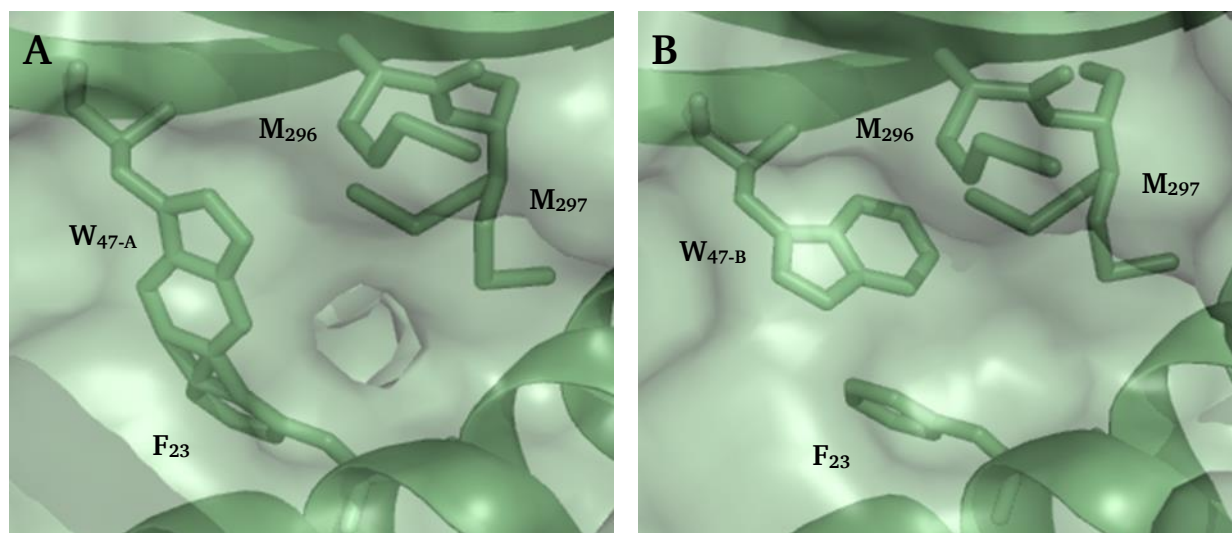
Schwieriger gestaltete sich die Interpretation der Elektronendichtekarte der I<sub>47</sub>W-Mutante, weshalb Modellierung und *Refinement* noch nicht abgeschlossen werden konnten. Die Konformation des eingefügten Tryptophans und dessen Einfluss auf die umliegenden Aminosäuren sind nicht vollständig ersichtlich. Die Modellierung der eingefügten Aminosäure deckt nach drei Runden *Refinement* zwar einen von zwei Bereichen zusätzlicher Elektronendichte ab, die Konformation führt jedoch aufgrund der räumlichen Nähe mit dem an der Porenbildung beteiligten F<sub>23</sub> zu sterischen Hinderungen (Abb. 79 A). Sowohl die 2  $F_o-F_c$  Elektronendichtekarte als auch die  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarte geben keinen Hinweis auf eine mögliche alternative Ausrichtung des F<sub>23</sub>, die dieser Hinderung entgegenwirken könnte. Die geringe Signalintensität spricht jedoch für eine gewisse Rotationsfreiheit der Phenylgruppe. Außerdem blieb neben der gewählten W<sub>47</sub>-Konformation (W<sub>47-A</sub>) noch ein weiterer größerer Bereich unbesetzter Elektronendichte in der  $F_o-F_c$  Differenzelektronendichtekarte übrig. Dieser deutet auf eine alternative Ausrichtung der Indol-Gruppe hin und wurde als zweite Konformation (W<sub>47-B</sub>) interpretiert und modelliert (Abb. 79 B). Die abgebildete Konformation dient bislang lediglich der

Veranschaulichung. Die exakte Ausrichtung des W<sub>47-B</sub>-Konformers muss erst noch durch weiteres *Refinement* bestätigt und optimiert werden.



**Abbildung 79:** (A) Darstellung der W<sub>47</sub>-Konformation mit der deutlichsten Elektronendichte in der Kristallstruktur der I<sub>47</sub>W-Mutante nach drei *Refinement*-Runden. (B) Alternative bzw. zusätzliche Konformation von W<sub>47</sub>, die in die unbesetzte, grüne Elektronendichte eingepasst wurde. Die 2 *F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>* Elektronendichtekarte ist als blaues Netz, die positive Elektronendichte in der *F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>* Differenzelektronendichtekarte als grünes Netz und die entsprechende negative Elektronendichte als rotes Netz dargestellt. Modellierung und Darstellung erfolgten in WinCoot.

Beim Vergleich beider Konformere zeigte sich ein konformationsabhängiger Verschluss der Eingangspore (Abb. 80). Das Tryptophan-Konformer W<sub>47-A</sub> zeigt eine geöffnete Eingangspore, wohingegen das Konformer W<sub>47-B</sub> deren Verschluss bewirkt. Eine finale Bestätigung dieses Modells war bislang jedoch nicht möglich.



**Abbildung 80:** Eingangspore der AaSOR mit *stick*-Darstellung der porenbildenden Aminosäuren und den beiden möglichen W<sub>47</sub>-Konformation in der I<sub>47</sub>W-Mutante. Bei Konformer W<sub>47-A</sub> ist die Eingangspore geöffnet (A). Bei Konformer W<sub>47-B</sub> erscheint sie geschlossen (B).

---

### 8.3. Diskussion

Das für die *HnSOR* postulierte Schema der Substrat- und Produktwege basiert auf der Annahme, dass lineare Schwefelspezies durch eine Eingangspore ins aktive Zentrum gelangen und nach der Katalyse die Produkte das aktive Zentrum durch eine Ausgangspore wieder verlassen (Veith, 2011a). Eine genauere Analyse der Kristallstrukturen wirft diesbezüglich jedoch Fragen auf. In den Kristallstrukturen der drei SOR-Spezies aus *Ac. ambivalens*, *Ac. tengchongensis* und *H. neapolitanus* ist in den Holoenzymen jeweils nur eine deutliche Porenöffnung zum aktiven Zentrum zu erkennen. Bei *AaSOR* und *AtSOR* bildet die als Eingangspore beschriebene Öffnung den Zugang zum aktiven Zentrum. Bei der *HnSOR* ist jedoch lediglich über die als Ausgangspore beschriebene Öffnung eine Verbindung zwischen aktivem Zentrum und der inneren Kavität des Enzyms erkennbar. Eine entsprechende Ausgangspore existiert zwar in den einzelnen Monomeren der *AaSOR* und *AtSOR*, im Holoenzym scheint sie jedoch durch die benachbarte Untereinheit blockiert zu werden. Die potentielle Eingangspore in der *HnSOR* wiederum erscheint durch eine direkt dahintergelegene Glutaminseitenkette als geschlossen. Unbekannt ist bislang, ob die beschriebenen Poren tatsächlich nicht existieren oder lediglich in der graphischen Darstellung der Kristallstrukturen nicht modelliert werden. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden durch ortsspezifische Mutagenese Porenmutanten von *AaSOR* und *HnSOR* generiert, um die beschriebenen Poren zu erweitern oder zu verschließen.

Die Mutanten Y<sub>102</sub>A, Y<sub>102</sub>G und Y<sub>102</sub>S sollten eine Verbindung zwischen innerer Kavität der *AaSOR* und der im Monomer erkennbaren Ausgangspore ermöglichen und so die in der *HnSOR* existierende Verbindung reproduzieren. Die Mutante Y<sub>102</sub>W diente dem vollständigen Verschluss der Ausgangspore des Monomers. Die enzymatischen Aktivitäten der Mutanten Y<sub>102</sub>A, Y<sub>102</sub>S und Y<sub>102</sub>W lagen auf vergleichbarem Niveau zur Aktivität des Wildtyps. Die Mutante Y<sub>102</sub>G, die in der mittels SWISS-MODEL-Server durchgeführten Modellierung die größte Verbindungspore aufweist, zeigte eine um etwa 50 % gesteigerte Oxygenase- und eine um 36 % erhöhte Reduktaseaktivität (Abb. 75). Diese Resultate legen nahe, dass die geplante Verbindung im Holoenzym bei der Mutante Y<sub>102</sub>G entstanden ist und dass die Substitutionen gegen die größeren Aminosäuren Alanin und Serin keine Porenöffnung bewirkten. Gesteigerte Aktivitäten als Resultat einer erweiterten Pore wurden bereits in früheren Arbeiten an den Beispielen der Tri- und Tetramerkkanäle sowie der Eingangspore der *AaSOR* beobachtet (Veith, 2011a). Die Aktivitätssteigerung der Y<sub>102</sub>G-Mutante kann somit auf die beabsichtigte Porenöffnung zurückgeführt werden. Die Existenz dieser erzeugten Pore wurde durch die Kristallstruktur der Y<sub>102</sub>G-Mutante verifiziert (Abb. 78). Die Y<sub>102</sub>W-Mutante zeigte trotz zusätzlichen Verschlusses der Ausgangspore keine Verringerung der enzymatischen Aktivität. Dies legt nahe, dass bereits im Wildtyp keine Verbindung zwischen

---

aktivem Zentrum und der inneren Kavität besteht und eine zusätzliche Verengung der Ausgangspore die Aktivität nicht beeinflusst.

Zur weiteren Absicherung dieser These wurde ein Verschluss der Eingangspore mit der Mutante I<sub>47</sub>W angestrebt. Eine Inaktivität dieser Mutante würde die Eingangspore als einzigen Zugang zum aktiven Zentrum bestätigen. Die Enzympräparationen wiesen jedoch eine um lediglich 23 % reduzierte Oxygenase und um 35 % reduzierte Reduktaseaktivität auf, was gegen die Theorie der Eingangspore als einzigem Zugang zum aktiven Zentrum sprechen würde (Abb. 75). Eine Erklärung für die hohe Restaktivität liefert jedoch die Kristallstruktur der I<sub>47</sub>W-Mutante, in der die Aminosäure W<sub>47</sub> in zwei möglichen Konformationen vorzuliegen scheint (Abb. 79). Während das B-Konformer einen Verschluss der Eingangspore bewirkt, liegt diese im Falle des A-Konformers geöffnet vor (Abb. 80). Die konformationsabhängige Öffnung der Pore erklärt die vergleichsweise hohe Aktivität der Mutante. Der für die *HnSOR* postulierte Substrat- und Produktweg ist somit nicht auf die *AaSOR* übertragbar, da hier lediglich die Eingangspore eine Verbindung zum aktiven Zentrum ermöglicht. Substrateintritt und Produktaustritt müssen über die gleiche Öffnung der aktiven Tasche erfolgen. Eine nach dem Abschluss der hier beschriebenen Experimente durchgeführte Analyse der *AaSOR* mittels CAVAR Analyst und MOLE bestätigte dieses Modell, da in keiner der beiden Analysen die Ausgangspore im Holoenzym als Verbindung zwischen aktivem Zentrum und zentraler Kavität erkannt wurde.

Bei der *HnSOR* hatten weder die Erweiterung der Ausgangspore durch die S<sub>104</sub>A-Mutante, noch die Verengung bzw. Schließung der Pore durch die S<sub>104</sub>M-Mutante sichtbare Auswirkungen auf die Enzymaktivität (Abb. 76). Lediglich bei Mutante L<sub>107</sub>A, bei der aufgrund der geplanten Porenerweiterung eine gesteigerte Enzymaktivität erwartet wurde, fand eine deutliche Verringerung der Aktivität auf unter 15 % statt. Eine Erklärung für diese drastische Verringerung der Aktivität könnte ein durch die Mutation bedingter Stabilitätsverlust des Enzyms sein, da auch die Ausbeuten bei Isolation und Reinigung nur sehr gering ausfielen. Die Interpretation der zum *HnSOR*-Wt vergleichbaren Aktivität der Mutanten S<sub>104</sub>A und S<sub>104</sub>M gestaltet sich schwierig, da die Auswirkungen der eingebrachten Mutationen nicht anhand einer Kristallstruktur bewertet werden konnten. Die Substitution von S<sub>104</sub> gegen Alanin stellt nur eine geringfügige Vergrößerung der Ausgangspore dar, was nicht zwangsläufig zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung führen muss. Bei der S<sub>104</sub>M-Mutante könnte ein mit der I<sub>47</sub>W-Mutante der *AaSOR* vergleichbarer Fall vorliegen, sodass die Methioninseitenkette möglicherweise in mehreren Konformationen vorliegt und kein permanenter Verschluss der Ausgangspore erzielt wurde. Fand jedoch ein erfolgreicher Verschluss der Pore statt, würde die Restaktivität hingegen die Existenz einer zweiten Verbindung mit der inneren Kavität der *HnSOR* durch die Eingangspore bestätigen. Die hierfür wichtige Mutante Q<sub>47</sub>A konnte jedoch trotz mehrfacher Wiederholung der Reinigung nicht isoliert und charakterisiert



---

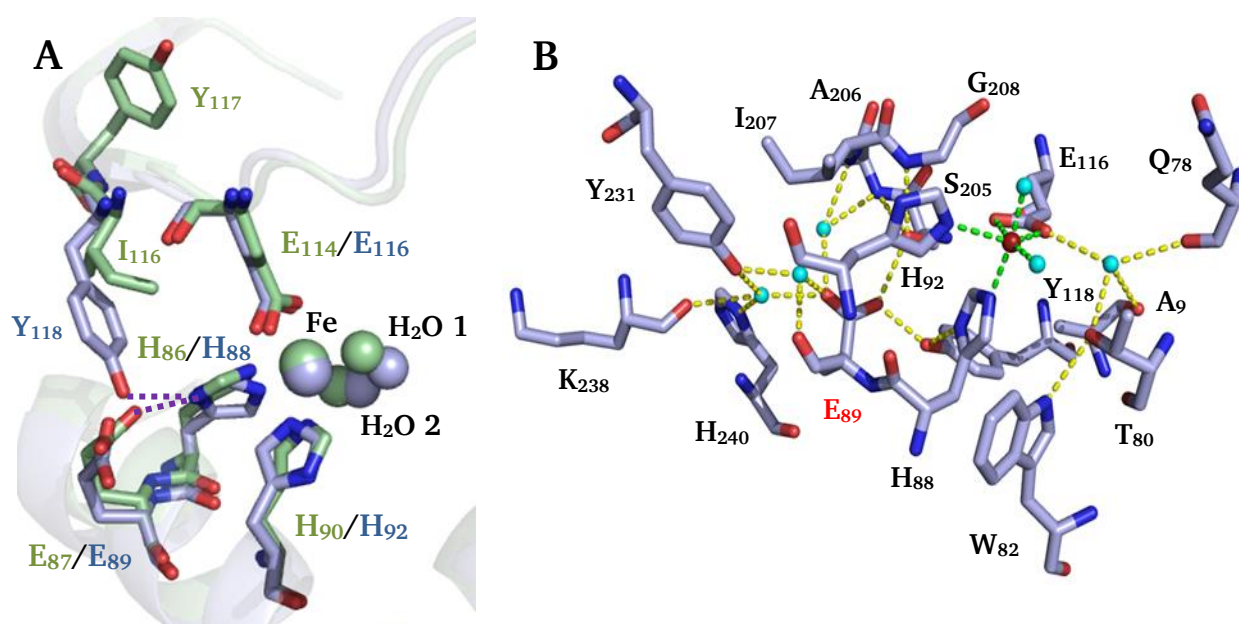
werden, was wiederum auf eine mögliche Destabilisierung des Enzyms durch die eingebrachte Aminosäuresubstitution hindeutet.

Unabhängig von den hier durchgeführten Mutagenesestudien wurde mit Hilfe der neuen hochauflösenden *HnSOR*-Kristallstruktur in Kapitel 7 bestätigt, dass das Enzym neben der Ausgangspore höchstwahrscheinlich auch über eine Eingangspore mit der inneren Kavität des Holoenzym in Verbindung steht. Ob es sich hierbei um die in diesem Kapitel beschriebene Pore handelt, ist fraglich. Wahrscheinlicher ist eine Verbindung über eine neu identifizierte Pore am persulfurierten C<sub>33</sub>. Der damals für die *HnSOR* postulierte Weg von Substrat und Produkten mit Substrateintritt durch eine Eingangspore und Produktaustritt durch eine Ausgangspore scheint daher möglich zu sein. Bei der *AaSOR* hingegen weisen die bisher durchgeführten Mutagenesestudien lediglich auf eine einzelne Verbindung zum aktiven Zentrum hin.

## 9. Mutationsanalysen der sekundären Koordinationssphäre

### 9.1. Einleitung

Die primären Koordinationssphären von *AaSOR* und *HnSOR* basieren auf einem identischen Aufbau. Das mononukleäre Eisen wird von zwei Histidinen und einem Glutamat koordiniert. Die sekundäre Koordinationssphäre ist bei beiden Enzymen jedoch grundverschieden. Sie wird in der *AaSOR* durch die Aminosäure E<sub>87</sub> gebildet, die über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem  $\delta$ -Stickstoffatom von H<sub>86</sub> in Kontakt steht. Die Carboxylgruppe der homologen Aminosäure E<sub>89</sub> befindet sich bei der *HnSOR* hingegen in einer zu großen Distanz für die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung (4,2 Å gegenüber 2,8 Å). Die sekundäre Koordinationssphäre der *HnSOR* wird stattdessen von Y<sub>118</sub> gebildet, das durch eine Wasserstoffbrückenbindung in Kontakt mit H<sub>88</sub> steht. Anstelle von Y<sub>118</sub> besitzt die *AaSOR* an gleicher Position ein Isoleucin (I<sub>116</sub>), das nicht zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken geeignet ist (Abb. 81 A).



**Abbildung 81:** (A) Überlagerung der aktiven Zentren von *AaSOR* (blau) und *HnSOR* (gelb). Eisenzentren und Wasserliganden sind als Kugeln dargestellt. Lila gestrichelte Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Y<sub>118</sub> und H<sub>88</sub> (*HnSOR*) sowie zwischen E<sub>87</sub> und H<sub>86</sub> (*AaSOR*) an. (B) Putatives Wasserstoffbrückennetzwerk (gelb gestrichelte Linien) und Koordinationssphäre des Eisens (grün gestrichelte Linien) im aktiven Zentrum der *HnSOR*. E<sub>89</sub> (rot) stellt die zentrale Aminosäure dieses Netzwerks dar, die über die meisten potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen verfügt.

Die sekundäre Koordinationssphäre der *AaSOR* war bereits zuvor durch Mutagenesestudien untersucht worden. Der Austausch von E<sub>87</sub> gegen Alanin zeigte in zwei unabhängigen Arbeiten stets eine drastische Verringerung der Enzymaktivität mit maximal 7 % Restaktivität. Die Resultate für E<sub>87</sub>D waren in beiden Arbeiten hingegen ambivalent und ergaben in einem Fall eine Verdreifachung der enzymatischen Aktivität und im anderen Fall eine leichte Aktivitätsverringerung (Seyfarth, 2006; Veith, 2011a). In der Kristallstruktur von E<sub>87</sub>D war



---

erkennbar, dass sich die Distanz zwischen D<sub>87</sub> und H<sub>86</sub>, verglichen mit E<sub>87</sub>, kaum änderte und die Wasserstoffbrückenbindung nicht zerstört wurde (Veith, 2011a). Der starke Aktivitätsverlust der E<sub>87</sub>A-Mutante zeigte, dass die sekundäre Koordinationssphäre der AaS<sub>OR</sub> durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen H<sub>86</sub>-E<sub>87</sub> einen entscheidenden Einfluss auf die enzymatische Aktivität nimmt.

Zur Absicherung dieser Resultate und einer besseren Interpretation der bislang kontroversen Ergebnisse bezüglich der E<sub>87</sub>D-Mutante wurden beide Aminosäuresubstitutionen in dieser Arbeit wiederholt. Darüber hinaus wurde versucht, die sekundäre Koordinationssphäre der HnS<sub>OR</sub> durch den Austausch von Y<sub>118</sub> gegen das in der AaS<sub>OR</sub> an identischer Position lokalisierte Isoleucin zu ersetzen und so die Wasserstoffbrückenbindung zu H<sub>88</sub> zu eliminieren. In der AaS<sub>OR</sub> erfolgte der komplementäre Austausch von I<sub>116</sub> gegen Tyrosin. Weiterhin wurde E<sub>89</sub>, die zu E<sub>87</sub> der AaS<sub>OR</sub> homologe Aminosäure, durch Alanin und Aspartat substituiert. E<sub>89</sub> steht jedoch nicht in direktem Kontakt mit einem der Eisenliganden, sondern scheint der zentrale Teil eines ausgedehnten Wasserstoffbrückennetzwerks in der aktiven Tasche der HnS<sub>OR</sub> zu sein (Abb. 81 B; Kap. 7).

## 9.2. Ergebnisse

Durch ortsspezifische Mutagenese wurden die in den Vektoren pASK-sor.05 und pASK\_HnS<sub>OR</sub> enthaltenen *sor*-Gene unter Verwendung der in Tabelle 2 aufgelisteten synthetischen Oligonukleotide mutagenisiert (siehe 3.2.1 und 3.2.3).

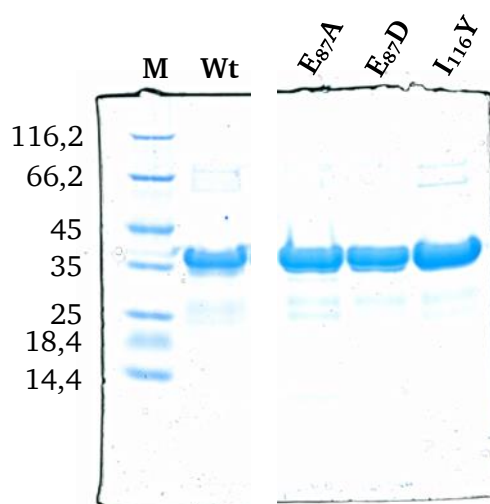
Die Proteinausbeuten der AaS<sub>OR</sub>-Mutanten erstreckten sich im Bereich von 0,17 bis 2,48 mg Protein/500 mL Kulturmedium (Tab. 29). Die Mutanten E<sub>87</sub>D und I<sub>116</sub>Y bewegten sich mit durchschnittlich 0,66 und 0,48 Eisenatome/Untereinheit im Bereich der gesetzten Toleranzgrenze von minimal 0,5 Eisenatome/Untereinheit. Lediglich die Mutante E<sub>87</sub>A wies mit einem relativen Eisengehalt von 0,18 Eisenatome/Untereinheit einen Wert deutlich unterhalb dieser Grenze auf. Aufgrund der geringen Ausbeuten bei der Proteinreinigung konnte der Test zur Eisenquantifizierung nur bei einer der Enzympräparationen mit deutlich reduzierter Proteinmenge durchgeführt werden. Aufgrund der mangelnden Sensitivität der Nachweismethode bei geringen Proteinmengen ist der kalkulierte Eisengehalt daher wenig aussagekräftig. Aus diesem Grund wurden die isolierten Proteinfractionen dennoch zur Aktivitätsbestimmung verwendet.

Trotz mehrfacher Wiederholung der Überexpressionen gelang es nicht, ausreichende Mengen der HnS<sub>OR</sub>-Mutanten E<sub>89</sub>A, E<sub>89</sub>D und Y<sub>118</sub>I zu isolieren. Das rekombinante Protein war weder in den Elutionsfraktionen noch im Durchfluss der chromatographischen Reinigung mittels SDS-PAGE nachweisbar. Eine biochemische Charakterisierung der HnS<sub>OR</sub>-Mutanten war daher nicht möglich.

**Tabelle 29:** Übersicht der gereinigten SOR-Mutanten mit der Spanne der erzielten Proteinausbeuten und dem gemittelten relativen Eisengehalt aller verwendeter Präparationen.

Mutante	Proteinausbeuten (mg/500 mL Medium)	Relativer Eisengehalt (nmol Fe/nmol Enzym)
<i>AaSOR E<sub>87</sub>A</i>	0,17 – 0,22	0,18
<i>AaSOR E<sub>87</sub>D</i>	0,91 – 2,48	0,66 ± 0,02
<i>AaSOR I<sub>116</sub>Y</i>	0,27 – 0,31	0,48 ± 0,05
<i>HnSOR E<sub>89</sub>A</i>	-	-
<i>HnSOR E<sub>89</sub>D</i>	-	-
<i>HnSOR Y<sub>118</sub>I</i>	-	-

Die übrigen SOR-Mutanten zeigten nach der Auftrennung via SDS-PAGE ein mit dem Wildtyp vergleichbares Bandenmuster. Alle Präparationen umfassten eine breite Bande auf Laufhöhe des Monomers bei rund 36 kDa, zwei schwache Banden bei etwa 66 kDa und einige kleinere Banden von Abbauprodukten der SOR (Abb. 82).

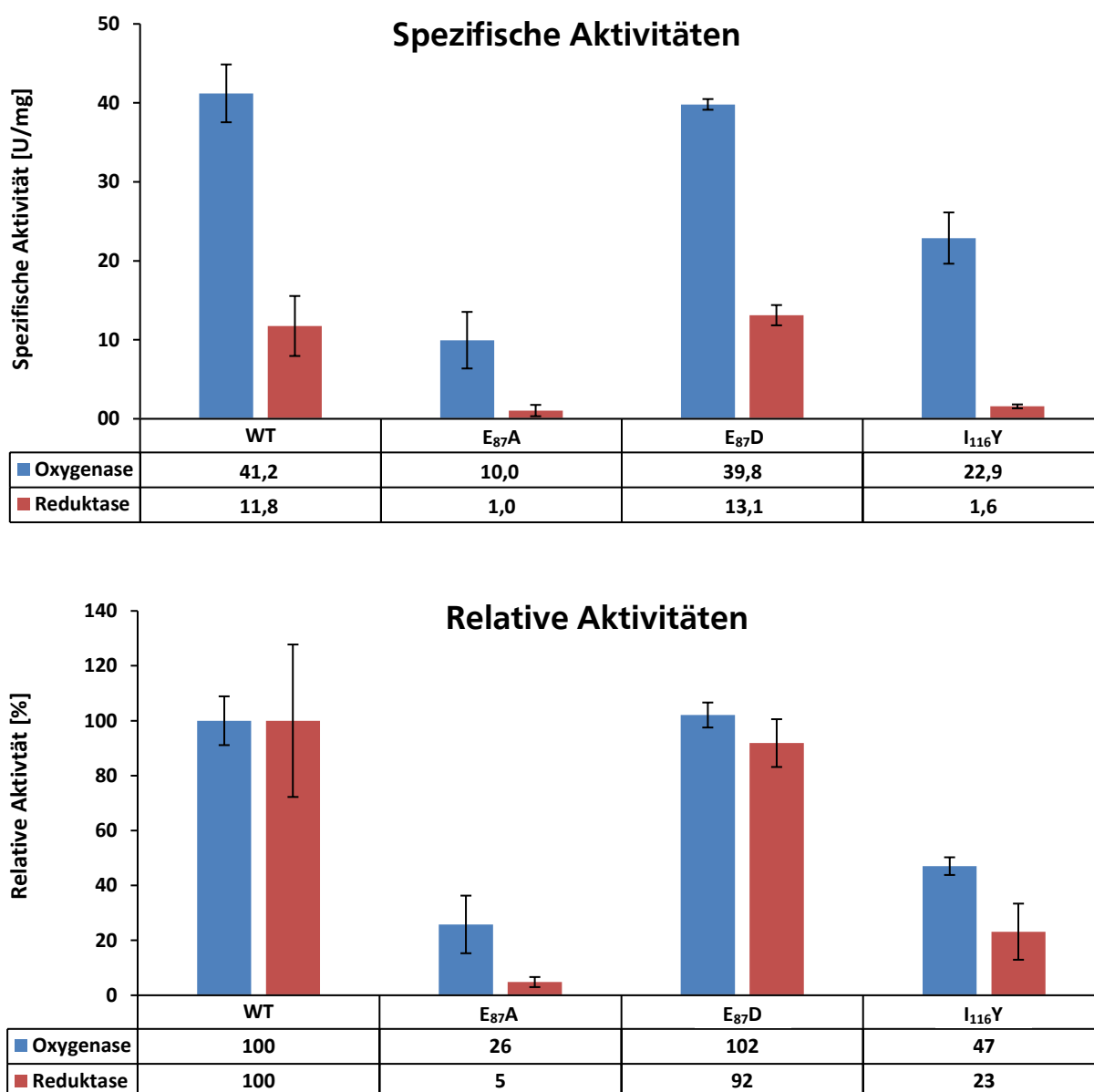


**Abbildung 82:** Coomassie-gefärbtes 10 % SDS-Gel der rekombinanten *AaSOR*-Wt und der Mutanten *E<sub>87</sub>A*, *E<sub>87</sub>D*, *I<sub>116</sub>Y*. **M**, Marker - Korrespondierende Bandengröße in kDa. 10 µg Protein pro Spur, Marker *unstained* # 26610.

Die Auswirkungen der jeweiligen Aminosäuresubstitutionen wurden anhand von Aktivitätsbestimmungen untersucht. Zur Schaffung einheitlicher Reaktionsbedingungen und der Vermeidung starker Schwankungen der *AaSOR*-Wt-Referenzaktivität wurden die relativen Aktivitäten der Mutanten durch Bezug auf eine zeitgleich durchgeführte *AaSOR*-Wt-Aktivitätsbestimmung ermittelt (Abb. 83).

Die durchschnittlichen Aktivitäten der *AaSOR*-Wt betrugen  $41,2 \pm 3,7$  U/mg für die Oxygenase- und  $11,8 \pm 3,8$  U/mg für die Reduktaseaktivität. Mit einer mittleren Oxygenaseaktivität von 39,8 U/mg (102 %) und einer mittleren Reduktaseaktivität von 13,1 U/mg (92 %) bewegte sich

die E<sub>87</sub>D-Mutante in einem vergleichbaren Aktivitätsbereich wie der Wildtyp. Die E<sub>87</sub>A-Mutante hingegen zeigte mit Aktivitäten von 10,0 U/mg (26 % Oxygenase) und 1,0 U/mg (5 % Reduktase) eine deutliche Verringerung der enzymatischen Aktivität. Mit einer Oxygenaseaktivität von 22,9 U/mg verringerte sich diese bei der I<sub>116</sub>Y-Mutante auf etwa 47 %. Ein etwas stärkerer Aktivitätsverlust wurde bei der Reduktaseaktivität beobachtet, die mit 1,6 U/mg lediglich noch 23 % der Aktivität des Wildtyps entsprach.



**Abbildung 83:** Spezifische und relative Aktivitäten von *Aa*SOR-WT und *Aa*SOR-Mutanten. (■) Oxygenaseaktivität (Thiosulfat + Sulfid), (■) Reduktaseaktivität (H<sub>2</sub>S). Die spezifischen Aktivitäten der Mutanten sind Mittelwerte aus mindestens vier Aktivitätsbestimmungen, die von zwei unabhängigen Enzympräparationen stammen. Die spezifische Aktivität der *Aa*SOR-WT stellt einen Mittelwert von Aktivitätsbestimmungen verschiedener *Aa*SOR-WT-Enzympräparationen dar. Die aufgeführten relativen Aktivitäten der *Aa*SOR-Mutanten beziehen sich nicht auf diesen Mittelwert, sondern auf die spezifische Aktivität einer *Aa*SOR-WT-Präparation, die zeitgleich mit der getesteten Enzymvariante isoliert wurde.

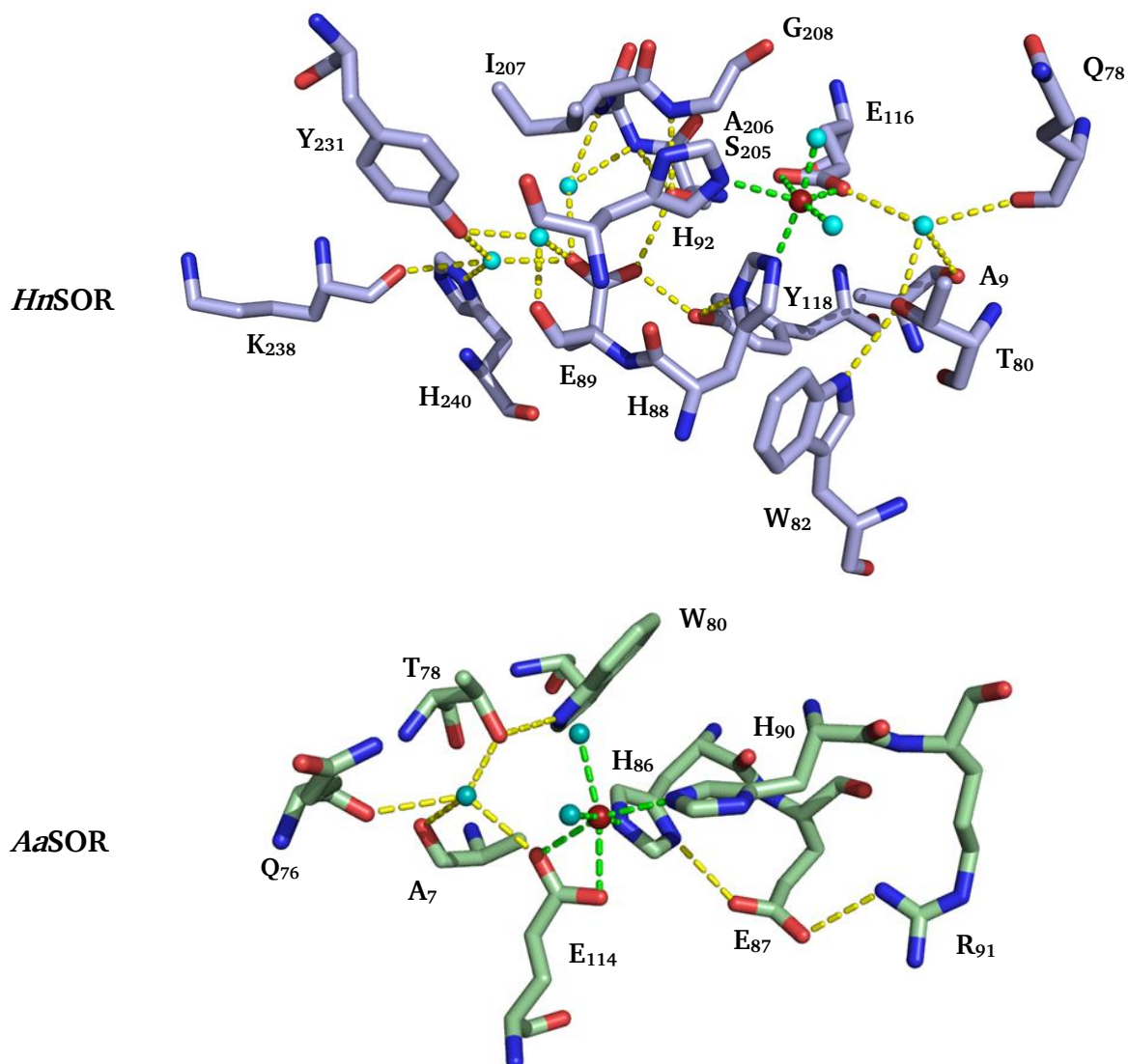
---

### 9.3. Diskussion

Das mononukleäre Eisenzentrum der AaSOR besitzt mit -268 mV ein außergewöhnlich niedriges Redoxpotential. Es wird vermutet, dass die sekundäre Koordinationssphäre und ein Wasserstoffbrückennetzwerk im aktiven Zentrum zu diesem Effekt beitragen (Veith, 2011a). Die Beobachtung, dass die Substitution von E<sub>87</sub> zu Alanin eine deutliche Verringerung der enzymatischen Aktivität bewirkt, bekräftigt diese Hypothese. Der starke Aktivitätsverlust dieses Aminosäureaustauschs konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Unterschiedliche Resultate lagen bislang zu den Auswirkungen der Substitution von E<sub>87</sub> zu Aspartat vor. In früheren Arbeiten wurde von einer leichten Verringerung bis hin zu einer Verdreifachung der enzymatischen Aktivität berichtet. Eine Wiederholung des Experiments in dieser Arbeit resultierte in einer E<sub>87</sub>D-Mutante mit einer zum Wildtyp vergleichbaren Aktivität. Die Existenz einer negativ geladenen Carboxylgruppe scheint von entscheidender Bedeutung für die Katalyse zu sein. In einer bereits verfügbaren Kristallstruktur von E<sub>87</sub>D ist der Abstand des eingebrachten Aspartats zu H<sub>86</sub> nur geringfügig gestiegen. Eine Wasserstoffbrückenbindung liegt damit vermutlich auch in der E<sub>87</sub>D-Mutante vor (Veith, 2011a). Die stark verringerte Aktivität der E<sub>87</sub>A-Mutante scheint zu belegen, dass die bestehende Wasserstoffbrückeninteraktion zwischen E<sub>87</sub> der sekundären Koordinationssphäre und dem Eisenliganden H<sub>86</sub> eine wichtige Rolle in der Katalyse spielt. Ob durch diese Interaktion das niedrige Redoxpotential des Eisenzentrums bedingt wird, ist bislang noch unklar. Die Präparation ausreichender Mengen der E<sub>87</sub>A-Mutante, zur Bestimmung des Redoxpotentials in Abwesenheit dieser Wasserstoffbrückenbindung mittels Redox titration, blieb erfolglos. Möglicherweise bewirkt das Verschwinden der Wasserstoffbrückenbindung zwischen E<sub>87</sub> und H<sub>86</sub> zusätzlich eine Destabilisierung des Enzyms, was die niedrigen Ausbeuten bei der Proteinisolation erklären würde. Bei Mutationsstudien am putativen Wasserstoffbrückennetzwerk der AaSOR war aufgefallen, dass eine Substitution von R<sub>91</sub> zu Alanin eine starke Aktivitätsverringern auf unter 20 % Restaktivität zur Folge hat (Veith, 2011a). R<sub>91</sub> befindet sich in Wasserstoffbrückendistanz zu E<sub>87</sub>. Eine Substitution von E<sub>87</sub> beeinflusst daher auch eine mögliche Interaktion mit R<sub>91</sub>, was einen zusätzlichen destabilisierenden Effekt haben könnte.

Die Beschreibung der sekundären Koordinationssphäre der HnSOR beschränkte sich bislang auf vergleichende Analysen anhand der Kristallstruktur. Trotz mehrfacher Wiederholung der Experimente gelang bei keiner der generierten Mutanten von E<sub>89</sub> und Y<sub>118</sub> eine Isolation des Enzyms nach heterologer Expression. Als Ursache wird eine destabilisierende Wirkung der eingeführten Substitutionen angesehen, da Mutageneseversuche der HnSOR am Beispiel der Porenmutationen bereits erfolgreich verlaufen waren (Kap. 8). In Kapitel 7 wird beschrieben, dass in der HnSOR vermutlich ebenfalls ein Wasserstoffbrückennetzwerk existiert, ähnlich dem der AaSOR. Das putative Wasserstoffbrückennetzwerk der HnSOR ist jedoch über einen wesentlich

weiteren Bereich der aktiven Tasche ausgeprägt (Abb. 84). Auffällig hierbei ist die Positionierung der Aminosäure E<sub>89</sub>. Diese ist aufgrund der Distanz zu H<sub>88</sub> nicht in der Lage, eine Wasserstoffbrücke zu diesem Eisenliganden auszubilden. Jedoch stellt die Carboxylgruppe das Zentrum des Wasserstoffbrückennetzwerks dar und steht in Kontakt mit Y<sub>118</sub>, S<sub>205</sub> und drei Wassermolekülen, die wiederum über Wasserstoffbrückenbindungen mit fünf weiteren Aminosäuren in Verbindung stehen. Es wurde bereits diskutiert, dass das Wasserstoffbrückennetzwerk der *HnSOR* möglicherweise entscheidend zur Stabilität des gesamten Enzyms beitragen könnte. Sowohl E<sub>89</sub> als auch Y<sub>118</sub> sind durch potentielle Interaktionen in dieses Netzwerk eingebunden. Das Fehlschlagen einer Substitution beider Aminosäuren bekräftigt diese Theorie. Zudem könnte die im Vergleich zur *AaSOR* geringere Anzahl an Salzbrücken durch dieses Netzwerk kompensiert werden.



**Abbildung 84:** Putative Wasserstoffbrückennetzwerke (gelb gestrichelte Linien) und Koordinationssphären der Eisenatome (grün gestrichelte Linien) in den aktiven Zentren von *HnSOR* und *AaSOR*. Die Eisenatome sind als rote und die Wassermoleküle als cyanfarbene Kugeln dargestellt.

---

## 10. Allgemeine Diskussion und Ausblick

---

### 10.1. Die Reaktionsprodukte der SOR

Die Oxidation von Schwefel und reduzierten Schwefelverbindungen stellt für *Bacteria* und *Archaea* eine der wichtigsten Formen der Energiegewinnung in vulkanischen Habitaten und extremen Umgebungen dar (Friedrich, 2005). Die Schwefel-Oxygenase/-Reduktase, als das initiale Enzym der Schwefeloxidation im thermoacidophilen Archaeon *Acidianus ambivalens*, ist das einzig bekannte Enzym, das im Rahmen des oxidativen Metabolismus die Oxidation von Schwefel zeitgleich an dessen Reduktion koppelt. Bei der durch die SOR katalysierten Reaktion handelt es sich um eine sauerstoffabhängige Disproportionierung von elementarem Schwefel mit Sulfit, Thiosulfat und Schwefelwasserstoff als nachweisbare Produkte (Kletzin, 1989). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Sulfit und H<sub>2</sub>S die primären Reaktionsprodukte dieser Katalyse darstellen und Thiosulfat ausschließlich als sekundäres Reaktionsprodukt im Rahmen einer nichtenzymatischen Reaktion des gebildeten Sulfits mit elementarem Schwefel entsteht. In diesem Zusammenhang ist die Etablierung einer HPLC-basierten Nachweismethode zur Quantifizierung der gebildeten Produkte, aber auch der verbrauchten Mengen an Substrat, von großem Interesse. Auf diesem Weg ist es möglich, präzisere Produktstöchiometrien zu ermitteln und die gebildeten Produkte in Korrelation mit den bei der Disproportionierung verbrauchten Mengen Schwefel zu setzen. Erste Versuche einer Produktquantifizierung durch Einsatz von Monobrombiman, der unter anderem die bislang problematische Verflüchtigung des gebildeten H<sub>2</sub>S unterbindet, verliefen vielversprechend (persönliche Mitteilung von Patrick Rühl). Entgegen früherer Beobachtungen konnte erstmals eine, wenn auch geringe, Aktivität der AaSOR bis zu einer Temperatur von 10 °C beobachtet werden (Abb. 16). Bei Anwendung der in dieser Arbeit optimierten Parameter des Enzymtests und Einsatz hoher Proteinmengen ist eine Aktivität unterhalb von 50 °C auch für die nah verwandten SORs aus *Ac. tengchongensis* und *Ac. brierleyi* als wahrscheinlich anzusehen. Da sich die bislang untersuchten SORs, unabhängig ihrer Herkunft, in ihren Temperaturoptima kaum unterschieden, wurden Aktivitäten im Temperaturbereich unter 50 °C bisher als spezielle Adaption an die Habitate mesophiler Mikroorganismen angesehen (Veith, 2012). Vielmehr scheint den bislang untersuchten SORs mesophiler Mikroorganismen (*HnSOR* und *TtSOR*) eine vergleichsweise hohe Grundaktivität gemein zu sein, sodass auch im niedrigen Temperaturbereich ein erhöhter Substratumsatz stattfindet (siehe Tab. 1 und Abb. 21). Da jedoch weder auf RNA- noch auf Proteinebene die tatsächliche Nutzung der SOR in *H. neapolitanus* oder *T. thiocyanoxidans* verifiziert wurde, bleiben mögliche Adaptionen des Enzyms an mesophile Habitate rein spekulativ. Unabhängig einer bestätigten Synthese in *T. thiocyanoxidans* sollte die Bestimmung der *Tt*-SOR-Kristallstruktur eines der nächsten Ziele darstellen. Das Enzym stellt die im phylogenetischen Stammbaum der SORs (Abb. 15) am tiefsten abzweigende SOR-Spezies dar und ist aufgrund der



---

fast nicht nachweisbaren Reduktaseaktivität von besonderem Interesse. Eine strukturelle Untersuchung könnte neue Einblicke in den Disproportionierungsmechanismus ermöglichen und Anhaltspunkte liefern, weshalb die Reduktasereaktion bedeutend geringer ausfällt als bei anderen SOR-Spezies. Erste hierfür benötigte Kristalle wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit erzeugt und sollten an einem Synchrotron auf ihre Eignung zur Diffraktion geprüft werden.

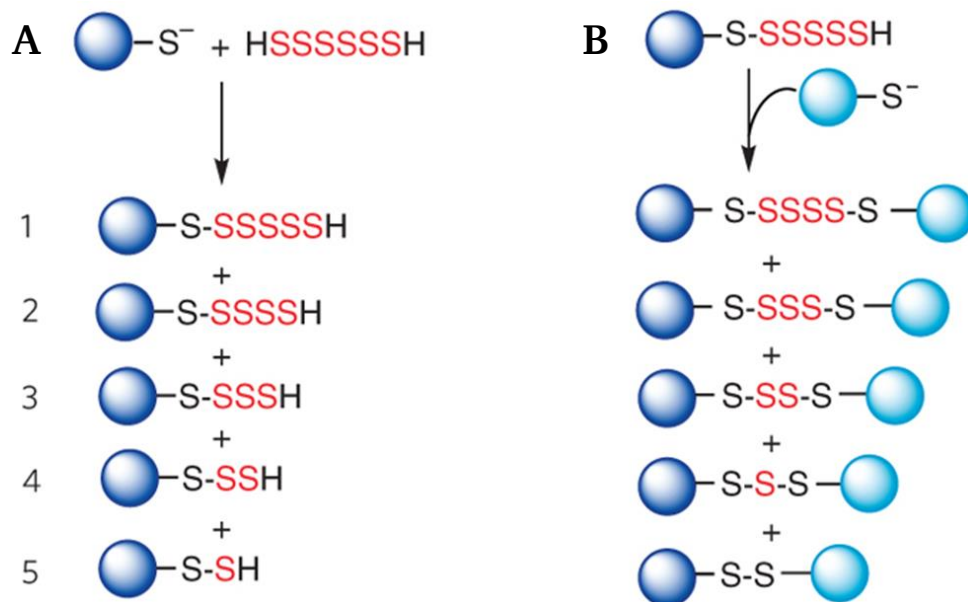
## 10.2. Das aktive Zentrum der SOR

### 10.2.1. Die konservierten Cysteine

Das aktive Zentrum der SOR befindet sich in einer geräumigen Tasche im Inneren der Untereinheit und steht mit der zentralen Kavität des Enzyms in Verbindung. Es umfasst ein mononukleäres Eisenzentrum und drei hochkonservierte Cysteine ( $C_{31}$ ,  $C_{101}$  und  $C_{104}$  bei AaSOR), von denen  $C_{31}$  persulfuriert vorliegt und aufgrund der für die Katalyse essentiellen Funktion als potentielle Substratbindungsstelle angesehen wird. Die anderen beiden Cysteine sind nicht essentiell, üben aber dennoch einen erheblichen Einfluss auf die enzymatische Aktivität aus (Urich *et al.*, 2005a). Mit dem Einsatz von Oligosulfid-Verbindungen, die als Substratanaloga eine Inhibition der SOR bewirken, wurde versucht, die erwartete Funktion von  $C_{31}$  als Substratbindungsstelle zu bestätigen. Diallyltrisulfid (DATS), Dimethyldisulfid (DDS), Di-*tert*-butyl-Polysulfid (DTBPS) und artifizielles Knoblauchöl (GO) stellten dabei effektive Inhibitoren der SOR dar, ließen aber keine spezifische Modifikation von  $C_{31}$  in den Kristallstrukturen erkennen. Stattdessen wurde sowohl am  $CSS_{31}$  als auch an  $C_{101}$  und  $C_{104}$  ein zusätzliches Schwefelatom, ohne Hinweis auf die organische Komponente der Inhibitoren, beobachtet (Abb. 32). Dabei stellte sich heraus, dass eine Inhibition der SOR mit den genannten Verbindungen lediglich über einen zweistufigen Prozess möglich ist, der eine Aktivierung der Inhibitoren durch eine Inkubation mit Schwefel bei hohen Temperaturen voraussetzt. Dies führt zu einer Vielzahl potentieller Zwischenprodukte, die im zweiten Inaktivierungsschritt unspezifisch alle Cysteine modifizieren. Eine Verifizierung von  $C_{31}$  als Substratbindungsstelle gelang auf diesem Weg nicht. Auch die noch ausstehende röntgenspektroskopische Analyse der GO-SOR wird diesbezüglich keine eindeutige Aussage zulassen, da DATS einen wesentlichen Bestandteil des Gemisches darstellt und die DATS-SOR eine Modifikation aller Cysteine aufwies. Jedoch zeigte das Differenzspektrum der GO-SOR (Abb. 29) einen deutlichen Peak mit einem Maximum bei 304 nm auf, der bei keinem anderen SOR-Inhibitorkomplex auftrat und typischerweise bei Eisen-Schwefel-Proteinen erkennbar ist (Curatti *et al.*, 2008). Die Ursache hierfür scheint die im Knoblauchölgemisch enthaltene Komponente Diallyldisulfid (DADS) zu sein. Möglicherweise lässt die Kristallstruktur der GO-SOR eine von den anderen Komplexen abweichende Art der Modifikation oder eine zusätzliche

Interaktion mit dem Eisenzentrum erkennen. In diesem Fall wäre die Präparation eines DADS-SOR-Komplexes von Interesse, um diesen Effekt unabhängig von anderen Bestandteilen des Knoblauchölgemisches zu untersuchen.

Die hitzeinduzierte Autosulfurierung scheint nicht länger ein Alleinstellungsmerkmal des essentiellen Cysteins darzustellen. In der neuen Kristallstruktur der *HnSOR* wurde neben der Persulfurierung von C<sub>33</sub> auch eine Persulfurierung der beiden nicht-essentiellen Cysteine C<sub>103</sub> und C<sub>106</sub> beobachtet (Abb. 61). Beiden Cysteinen wurde bislang eine Beteiligung an der korrekten Positionierung der Schwefelkette im aktiven Zentrum zugeschrieben (Urich *et al.*, 2005c; 2006). Die Ausrichtung der terminalen  $\delta$ -Schwefelatome variierte in den Untereinheiten der *HnSOR*. In 13 Untereinheiten scheinen beide Cysteine über eine Tetrasulfidbrücke miteinander verbunden zu sein. Da beide Cysteine in allen bekannten SOR-Spezies hoch konserviert sind, kann davon ausgegangen werden, dass bei anderen SORs vergleichbare Formationen auftreten können. Ob sie eine Bedeutung für die Katalyse haben, ist unbekannt. Die Existenz zusätzlicher Schwefelatome an den Cysteinen legt jedoch nahe, dass auch sie mit dem Substrat interagieren könnten. Thiolgruppen von Cysteinen vermögen komplexe Reaktionen mit Polysulfiden einzugehen, was zu variablen Produktgemischen oder intramolekularen Schwefelbrücken führen kann (Abb. 85; Mishanina *et al.*, 2015).



**Abbildung 85:** Darstellung der Komplexität der nicht-katalysierten Proteinmodifikationen durch Polysulfide. **(A)** Eine reaktive Thiolgruppe eines Proteins (dunkelblaue Kugel) kann eines von mehreren Schwefelatomen der Polysulfidkette angreifen und so verschiedene Proteinmodifikationen (1-5) bewirken. **(B)** Durch Reaktion des modifizierten Cysteins mit einer Thiolgruppe eines anderen Cysteins desselben Proteins (hellblaue Kugel) kann eine intramolekulare Verbindung zwischen beiden Cysteinen mit variabler Anzahl überbrückender Schwefelatome entstehen (Mishanina *et al.*, 2015).

---

Vergleichbare Reaktionen wurden bereits für die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren beschrieben und ließen ein zusätzliches Schwefelatom in der Kristallstruktur erkennen. Es wäre denkbar, dass auch an den nicht verbundenen Cysteinen Produktgemische vorliegen, diese aber in der Kristallstruktur unterrepräsentiert sind bzw. bedingt durch eine erhöhte Mobilität nicht erfasst wurden. Die Bedeutung dieser Beobachtung für die katalysierte Reaktion ist noch unklar, jedoch scheinen die beiden nicht-essentiellen Cysteine nicht nur an der Positionierung einer an C<sub>31</sub> gebundenen Schwefelkette beteiligt zu sein, sondern selbst, zumindest temporär, Interaktionen mit dieser eingehen zu können.

Da in der Kristallstruktur der *HnSOR* erstmalig eine neuartige Modifikation der Cysteine in einer SOR beobachtet wurde, bietet sich eine Co-Kristallisation des Enzyms in Gegenwart von Sulfid, Ammoniumsulfid, elementarem Schwefel und Polysulfid an, um potentielle Intermediate des katalytischen Zyklus oder einen Enzym-Substrat-Komplex nachzuweisen. Auch könnte auf diesem Weg eine mögliche Beteiligung der Tetrasulfidbrücke bei der Katalyse untersucht werden. Versuche einer Co-Kristallisation bei der *AaSOR* blieben bislang erfolglos, weshalb die *HnSOR* eine geeignete Alternative darstellen könnte.

### 10.2.2. Das Metallzentrum und das putative Wasserstoffbrückennetzwerk

Die Koordination des mononukleären Eisenatoms im aktiven Zentrum der SOR erfolgt durch die faciale 2-His-1-Carboxylat-Triade. Komplettiert wird die primäre Koordinationssphäre von zwei Wassermolekülen. Die sekundäre Koordinationssphäre wird von der Aminosäure E<sub>87</sub> (*AaSOR*) bzw. Y<sub>118</sub> (*HnSOR*) gebildet. Die Substitution von E<sub>87</sub> gegen Alanin und die damit verbundene Eliminierung der Wasserstoffbrückenbindung zu H<sub>86</sub> bewirkte einen starken Aktivitätsverlust (Kap. 9). Eine Substitution gegen Aspartat hingegen hatte keinen Aktivitätsverlust zur Folge, was auf eine noch immer vorhandene Wasserstoffbrückenbindung zu H<sub>86</sub> rückzuführen ist (Veith, 2011a). Dies bestätigt die Wichtigkeit der sekundären Koordinationssphäre für die enzymatische Aktivität. Unklar ist dabei bislang, ob die Wasserstoffbrückenbindungen zum Eisenliganden diesen lediglich stabilisiert oder sogar Einfluss auf das Redoxpotential des Eisenzentrums nimmt, wie es bereits für die sekundäre Koordinationssphäre der Lipxygenase der Sojabohne und der Superoxiddismutase von *E. coli* beobachtet wurde (Miller, 2007; Schenk, 2003). Für weiterführende Experimente bietet sich daher eine Bestimmung des Redoxpotentials der Eisenzentren der Mutanten E<sub>87</sub>A und E<sub>87</sub>D an.

Die sekundäre Koordinationssphäre der *HnSOR* wird durch die Aminosäure Y<sub>118</sub> gebildet, die über eine Wasserstoffbrückenbindung in Kontakt mit dem Eisenliganden H<sub>88</sub> steht (Abb. 62). Die Isolation einer gegen Isoleucin substituierten Mutante gelang aber nicht. Auch eine Substitution von E<sub>89</sub>, das eine homologe Aminosäure zu E<sub>87</sub> der *AaSOR* darstellt, blieb erfolglos. Die

---

Kristallstruktur der *HnSOR* zeigte, dass beide Aminosäuren miteinander über eine Wasserstoffbrückenbindung verbunden sind und Teil eines weit ausgedehnten Wasserstoffbrückennetzwerks in der aktiven Tasche zu sein scheinen (Abb. 64). Ein vergleichbares Netzwerk, wenn auch auf einen kleineren Bereich des aktiven Zentrums beschränkt, wurde bereits für die *AaSOR* postuliert. E<sub>89</sub> bildet dabei das Zentrum des potentiellen Wasserstoffbrückennetzwerks der *HnSOR* und steht in Kontakt mit Y<sub>118</sub>, S<sub>205</sub> und drei Wassermolekülen, die wiederum über Wasserstoffbrückenbindungen mit fünf weiteren Aminosäuren verbunden sind (Tab. 25). Das Netzwerk könnte entscheidend zur Stabilität der *HnSOR* beitragen und so die im Vergleich zur *AaSOR* geringere Anzahl an internen Salzbrücken kompensieren. Die eingebrachten Substitutionen scheinen dieses Netzwerk zu unterbrechen und so die gesamte Untereinheit zu destabilisieren. Die Substitution weiterer am Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligter Aminosäuren bietet sich zur Überprüfung dieser Hypothese an. Besonders geeignet scheinen hierzu die Aminosäuren T<sub>80</sub>, S<sub>205</sub>, Y<sub>231</sub> und H<sub>240</sub>, da diese nicht über das *backbone*, sondern über ihre funktionellen Gruppen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

Das Eisenatom im aktiven Zentrum der SOR liegt im Grundzustand als Fe<sup>3+</sup> vor. Nach Inkubation des Enzyms mit Schwefel bei hohen Temperaturen wird es zu Fe<sup>2+</sup> reduziert (Urich *et al.*, 2004). Durch die Rückfaltung denaturierter *AaSOR inclusion bodies* in Gegenwart von hochreinem Cobalt, Gallium, Mangan bzw. Nickel gelang es, biologisch aktive SOR-Derivate zu präparieren (Abb. 36). Cobalt, Mangan und Nickel wurden im Oxidationszustand 2+ detektiert, Gallium im Oxidationszustand 3+ (Abb. 41). Bei keiner der eisensubstituierten SORs wurde nach Inkubation mit Schwefel bei 80 °C ein Redoxwechsel des Metallzentrums beobachtet. Der für Eisen beobachtete Redoxwechsel scheint daher kein essentieller Bestandteil der Katalyse zu sein. Um die Vorgänge am mononukleären Eisenzentrum besser untersuchen und auch transiente Änderungen des Oxidationszustands während der Katalyse erfassen zu können, sollte die *Stopped-Flow*-Spektroskopie etabliert werden. Mit deren Hilfe können direkte Sauerstoff-Eiseninteraktionen während der Katalyse in Form kurzzeitiger Absorptionsänderungen erfasst werden. Auf diesem Weg könnte final beantwortet werden, ob es sich bei der Sauerstoffaktivierung um einen metall- oder substratvermittelten Prozess handelt.

### 10.3. Substrat- und Produktwege innerhalb der SOR

Basierend auf den Resultaten von Strukturanalysen und Mutagenesestudien wurde in einer früheren Arbeit ein Modell für die Substrat- und Produktwege innerhalb der SOR postuliert, von dem angenommen wurde, dass es für alle SOR-Spezies universell anwendbar sei. Es basiert auf der Annahme, dass lineare Schwefelspezies durch die an den Vierfachsymmetrieachsen lokalisierten Tetramerkanäle in die innere Kavität des Enzyms und von dort weiter durch eine

---

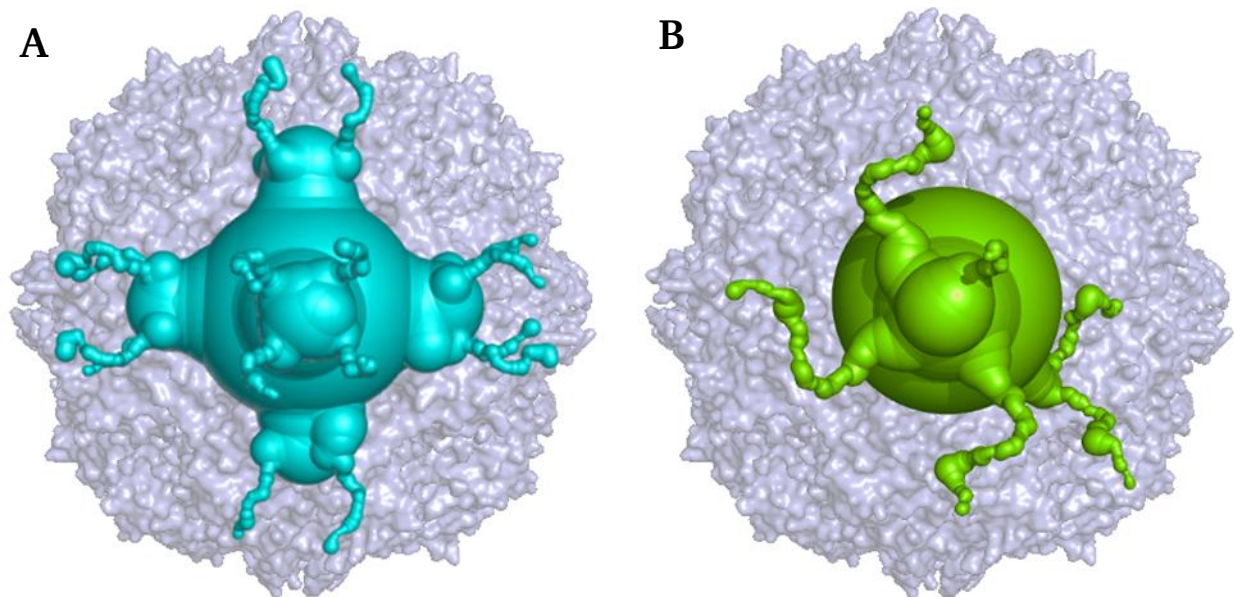
Eingangspore ins aktive Zentrum gelangen. Nach der Katalyse gelangen die Reaktionsprodukte durch das Passieren einer Ausgangspore erneut in die zentrale Kavität der SOR und verlassen das Enzym über die an den Dreifachsymmetrieachsen lokalisierten Trimerkanäle (Abb. 48; Veith, 2011a).

Um die Anwendbarkeit dieses Modells anhand der neuen *HnSOR*-Kristallstruktur zu überprüfen, wurden erstmals mit Hilfe von MOLE und CAVER softwaregestützte Analysen durchgeführt, die eine Identifizierung und Vermessung von Poren und Kanälen innerhalb eines Enzyms ermöglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Durchmesser von Tetramer- und Trimerkanal sehr limitiert sind. Der Durchmesser des mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleideten Tetramerkanaals (Abb. 55) wird durch den äußeren Phenylalaninring (F<sub>143</sub>) im oberen Bereich des Kanals auf etwa 1,60 Å begrenzt. Der Trimerkanal (Abb. 56) weist am engsten Punkt zwischen den Alanin-Seitenketten (A<sub>226</sub>) einen Durchmesser von lediglich 1,35 Å auf. An ihren engsten Punkten unterschreiten beide postulierten Kanäle deutlich den Durchmesser eines Schwefelatoms (etwa 2 Å) und scheinen daher für eine Passage einer Schwefel- bzw. Polysulfidkette oder der Produkte der SOR-Reaktion ungeeignet zu sein. Die Seitenketten der Aminosäuren des Phenylalaninrings weisen jedoch einen erhöhten B-Faktor und damit eine gesteigerte Flexibilität auf, wodurch sich der Porendurchmesser bei erhöhten Temperaturen vergrößern könnte. Ein Indiz für die tatsächliche Funktion als Zugang zum Inneren des Enzyms lieferten Mutationsanalysen der *AaSOR*. Dort wird der innere Durchmesser des Tetramerkanaals durch zwei F-Ringe limitiert. Eine Deletion des äußeren Rings führte zu einer Verdreifachung der Enzymaktivität, obwohl der innere F-Ring, dessen Dimensionen dem F-Ring der *HnSOR* entsprechen, noch vorhanden war (Seyfarth, 2006; Veith, 2011a). Die trotz des intakten inneren F-Rings beobachtete Aktivitätssteigerung weist darauf hin, dass der limitierte Porendurchmesser ausreicht, um einen Eintritt des Substrats zu ermöglichen und der Tetramerkanal in der *AaSOR* und *HnSOR* als Zugang fungieren kann. Eine Überprüfung der strukturellen Auswirkungen der Deletion anhand einer Kristallstruktur fand bislang jedoch nicht statt.

Der Trimerkanal hingegen scheint aufgrund des sehr begrenzten Durchmessers in Kombination mit einem geringen B-Faktor, und der damit einhergehenden begrenzten Flexibilität der beteiligten Aminosäuren, nicht als Austrittspunkt der Produkte der SOR-Reaktion zu fungieren. Stattdessen könnten zwei neu identifizierte Poren diese Aufgabe übernehmen. Den wahrscheinlichsten Austrittspunkt stellt dabei eine Pore an der Basis der schornsteinähnlichen Strukturen dar. Der mittlere Durchmesser dieser Pore ist mit 2,32 Å um etwa 1 Å größer als der Durchmesser des Trimerkanals. Sie wird von den Aminosäuren Q<sub>128</sub>, R<sub>309</sub> und K<sub>310</sub> gebildet und führt über einen kurzen Kanal ins Enzyminnere. Potentiell können 24 dieser Kanäle existieren (jeweils vier an jedem Schornstein), 21 wurden bei der Analyse erfasst (Abb. 86 A). Die zweite



Pore ist über einen sehr langen Kanal mit der inneren Kavität verbunden (Abb. 86 B). Sie ist an der Schnittstelle zweier Untereinheiten lokalisiert und wird von den Aminosäuren P<sub>246</sub>, G<sub>247</sub>, T<sub>249</sub> und P<sub>250</sub> gebildet. Bei der Analyse wurden fünf von 24 potentiell existierenden Verbindungen identifiziert, deren Porendurchmesser jedoch starke Schwankungen aufwies und im Mittel 1,96 Å betrug. Beide Verbindungen müssen aufgrund ihres im Vergleich zum Tetramerkanal größeren Porendurchmessers als alternative bzw. zusätzliche Substrat- und Produktwege in Betracht gezogen werden.



**Abbildung 86:** Überlagernde Darstellungen des *HrsOR*-Holoenzym mit den von MOLE identifizierten Poren und Kanälen, die die innere Kavität mit der Oberfläche des Enzyms verbinden. (A) Pore an der Basis der schornsteinähnlichen Strukturen (B) Pore an der Schnittstelle zweier Untereinheiten.

Neben den beschriebenen Verbindungen zwischen Enzymoberfläche und innerer Kavität umfasst das ursprüngliche Modell der Substrat- und Produktwege zwei weitere Poren, welche die innere Kavität und die aktive Tasche einer jeden Untereinheit verbinden. Die Existenz dieser beiden Poren wurde für die *HnsOR* bestätigt. Als Zugang zum aktiven Zentrum scheint dabei neben der ursprünglich vermuteten Eingangspore (Abb. 57), deren Größe durch das dahintergelegene Q<sub>47</sub> auf 1,92 Å limitiert wird, eine neu identifizierte Pore direkt am persulfurierten C<sub>33</sub> zu fungieren (Abb. 60). Sie wird von den Seitenketten der Aminosäuren P<sub>30</sub>, F<sub>45</sub> und M<sub>303</sub> gebildet. Eine Öffnung dieser Pore erfolgt in Abhängigkeit der M<sub>303</sub>-Konformation, wobei der Porendurchmesser je nach Konformation 2,9 - 3,1 Å beträgt.

Eine weitere Pore wird von den Seitenketten der Aminosäuren F<sub>100</sub>, F<sub>210</sub>, L<sub>107</sub> und S<sub>104</sub> gebildet und besitzt einen mittleren Durchmesser von 2,8 Å (Abb. 59). Sie wurde aufgrund ihrer räumlichen Nähe zum Trimerkanal bislang als Ausgangspore der aktiven Tasche angesehen. Da der



---

Trimerkanal jedoch augenscheinlich nicht als Ausgang für die Produkte aus dem Enzym fungieren kann, ist auch eine solch spezifische Funktion der Pore fraglich.

Generell ist das bisher aufgestellte Modell der Substrat- und Produktwege im Enzym als unwahrscheinlich einzustufen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in der *HnSOR* mehr Poren und Kanälen vorliegen, als von dem bisherigen Modell abgedeckt werden. Daher scheinen spezifische, gerichtete Wege des Substrats und der Produkte, wie sie aufgrund der räumlichen Nähe der einzelnen Poren zueinander vermutet wurden, nicht vorzuliegen. Vielmehr ist anzunehmen, dass die Poren und Kanäle gleichwertig eine Passage für Substrat und Produkte ermöglichen. Auch die universelle Anwendbarkeit des Modells für alle SOR-Spezies kann nicht bestätigt werden, da die in der früheren Arbeit als Ausgangspore aus der aktiven Tasche interpretierte Pore nicht in der *AaSOR* existiert. Demnach wäre das aktive Zentrum der *AaSOR* über lediglich eine Pore mit der inneren Kavität verbunden, die *HnSOR* hingegen über zwei bis drei Poren. Diese im Vergleich zur *HnSOR* limitierenden Möglichkeiten eines Substrat- und Produktaustauschs im aktiven Zentrum könnten eine Erklärung für die geringere Aktivität der *AaSOR* liefern. Um diese Hypothese zu überprüfen und einen effizienten Vergleich zu ermöglichen, sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Porenanalysen gleichwertig auch für die *AaSOR* stattfinden. Neben den strukturellen Vergleichen und softwarebasierten Charakterisierungen von Poren und Kanälen sollten weiterführend Molekulardynamik-Simulationen für beide Enzyme erfolgen. Hierbei werden Faktoren wie das Verhalten einzelner Aminosäuren bei erhöhten Temperaturen berücksichtigt, was besonders die Tetramerkanäle in ihrer möglichen Funktion als Eingangskanal für lineare Schwefelspezies bestätigen oder widerlegen kann.

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abkürzungen gängiger molekularbiologische Definitionen und SI-Einheiten sind gemäß der *American Society for Microbiology* (ASM) nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt ([http://jb.asm.org/site/misc/journal-ita\\_abb.xhtml#02](http://jb.asm.org/site/misc/journal-ita_abb.xhtml#02)).

°	Grad
σ	Noise (Rauschen)
Å	Angström
AaSOR	<i>Acidianus ambivalens</i> SOR
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
ADA	N-(2-Acetamido)-iminodiessigsäure
ADP	<i>Atomic Displacement Parameter</i>
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AqSOR	<i>Aquifex aeolicus</i> SOR
AtSOR	<i>Acidianus tengchongensis</i> SOR
asym.	Asymmetrisch
BCA	Bicinchoninsäure
B-Faktor	Temperaturfaktor
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMTMS	Bis(methylthiomethyl)-sulfid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CD	Circulardichroismus
CSS	Cysteinpersulfid
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
DATS	Diallyltrisulfid
DDS	Dimethyldisulfid
deg	<i>degree</i> (Grad)
DES	Diethylsulfid
DTBPS	Di- <i>tert</i> -butyl-Polysulfid
DTTC	Dimethyltrithiocarbonat
DTS	Dimethyltrisulfid
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DLS	Diamond Light Source
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
Fc	<i>calculated structure factor</i>
Fo	<i>observed structure factor</i>
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
Gl.	Gleichung
GO	<i>garlic oil</i> (Knoblauchöl)
HABA	Hydroxy-Azophenyl Benzoesäure
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HnSOR	<i>Halothiobacillus neapolitanus</i> SOR
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography</i>
I	Intensität
MPD	2-Methyl-2,4-pentanediol
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm

Ox	Oxygenase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethyleneglycol
R	<i>R factor</i>
Red	Reduktase
R <sub>free</sub>	<i>Free R factor</i>
R <sub>meas</sub> (=R <sub>rim</sub> )	<i>Redundancy-independent merging R factor</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
R <sub>pim</sub>	<i>Precision indicating merging R factor</i>
R <sub>sym</sub> (=R <sub>merge</sub> )	<i>Merging R value</i>
R <sub>work</sub>	<i>Working R factor</i>
S <sup>0</sup>	Elementarer Schwefel
SDO	Schwefeldioxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOR(s)	Schwefel-Oxygenase/-Reduktase(n)
Sox	<i>Sulfur oxidizing</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPTZ	2,4,6-Tripyridyl-s-1,3,5-triazin
T <sub>m</sub>	<i>Melting temperature</i> (Schmelztemperatur)
TtSOR	<i>Thioalkalivibrio thiocyanoxidans</i> SOR
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Unit(s)
ÜN	Über Nacht
UV/VIS	<i>Ultra-violet/visible</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
v/w	<i>volume per weight</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>
Wt	Wildtyp

## Kristallographische Parameter und Qualitätsindikatoren

I/σ(I)	Signal-Rausch-Verhältnis
B	$= 8 \pi^2 \langle u^2 \rangle$
R <sub>pim</sub>	$= \sum_h [1/(N-1)]^{1/2} \sum_i  I_i(h) - \langle I(h) \rangle  / \sum_h \sum_i I_i(h)$
R <sub>meas</sub> (=R <sub>rim</sub> )	$= \sum_h [N/(N-1)]^{1/2} \sum_i  I_i(h) - \langle I(h) \rangle  / \sum_h \sum_i I_i(h)$
R <sub>sym</sub> (=R <sub>merge</sub> )	$= \sum_h \sum_i  I_i(h) - \langle I(h) \rangle  / \sum_h \sum_i I_i(h)$
R <sub>work</sub>	$= \sum_h   F_o _h -  F_c _h  / \sum_h  F_o _h$

R<sub>free</sub> wurde wie R<sub>work</sub> berechnet, jedoch nur für 0,38 - 7,9 % (in Abhängigkeit der jeweiligen Kristallstruktur) zufällig ausgewählte Reflektionen, die im *Refinement* ausgelassen wurden.

Mit:

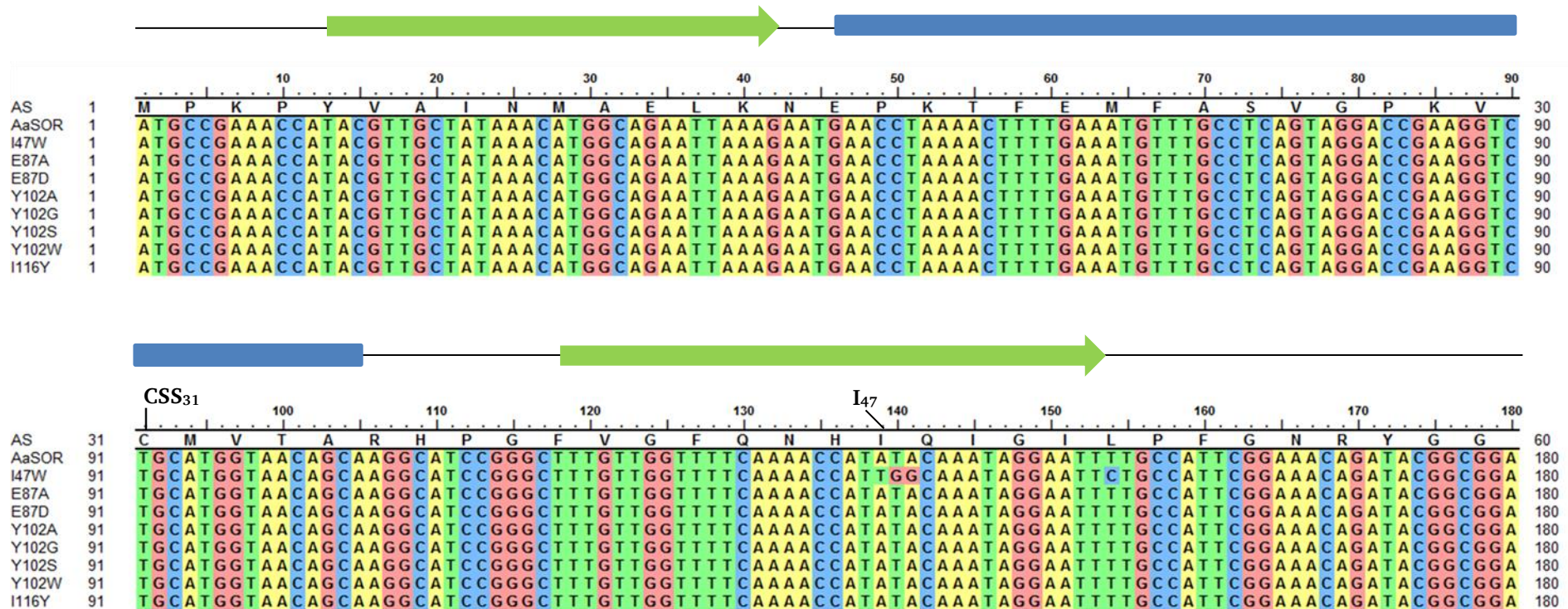
F <sub>c</sub>	<i>calculated structure factor</i>
F <sub>o</sub>	<i>observed structure factor</i>
N	Datenredundanz
I	Beobachtete Intensität
⟨I⟩	Gemittelte Intensität von multiplen Beobachtungen der symmetrieabhängigen Reflektionen
⟨u <sup>2</sup> ⟩	<i>mean square atomic displacement</i>

## Nukleotidalignments

Multiple Nukleotidalignments der in dieser Arbeit erstellten Mutanten von AaS<sub>OR</sub> und HnS<sub>OR</sub> und der zugehörigen Wildtyp-Proteine. Die erste Zeile beschreibt die Aminosäuresequenz des entsprechenden Aa/HnS<sub>OR</sub>-Wt.

→ : β-Faltblätter; : α-Helices; CSS<sub>31/33</sub>: Cysteinpersulfid im aktiven Zentrum von Aa/HnS<sub>OR</sub>; C<sub>101/103</sub> + C<sub>104/106</sub>: hochkonservierte Cysteine im aktiven Zentrum von Aa/HnS<sub>OR</sub> Fe: Eisenliganden; E<sub>87</sub>: sekundäre Koordinationssphäre der AaS<sub>OR</sub>; Y<sub>118</sub>: sekundäre Koordinationssphäre der HnS<sub>OR</sub>; AS: Aminosäuren

### AaS<sub>OR</sub>:



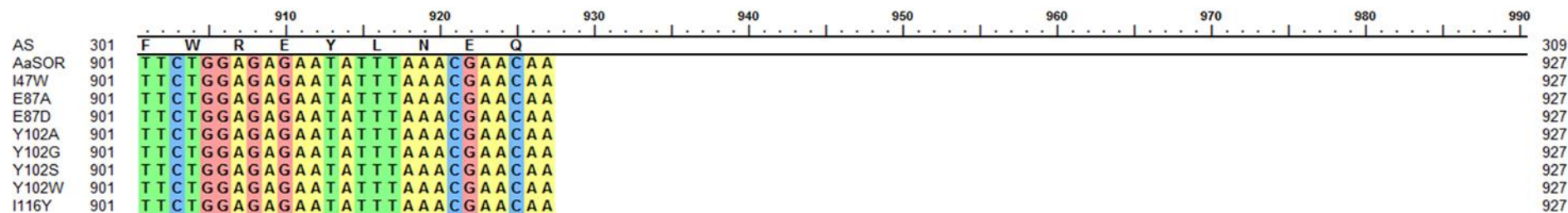
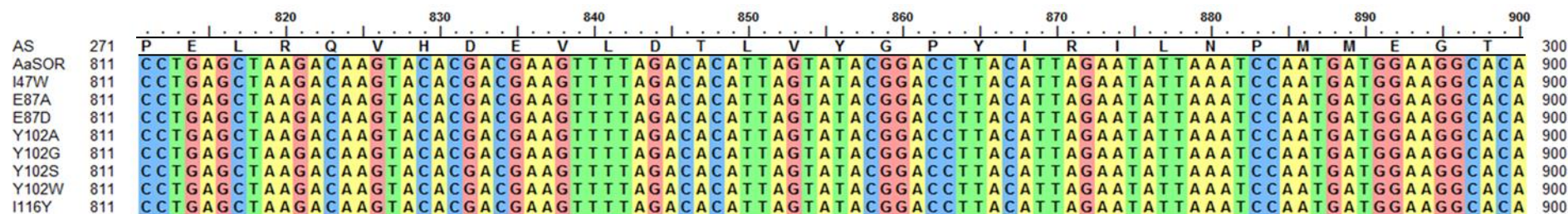
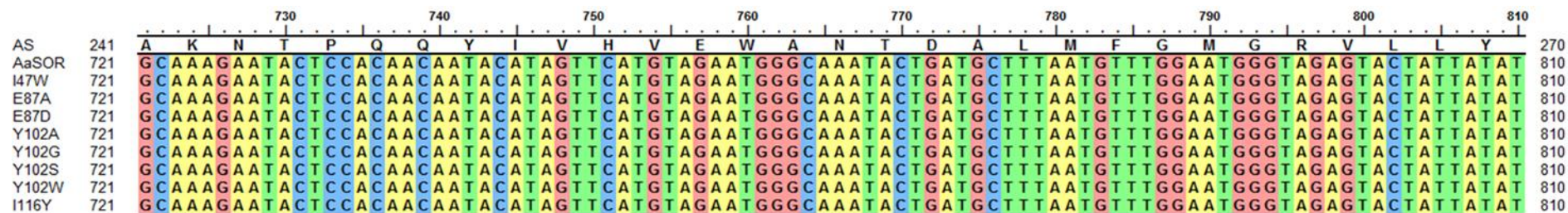






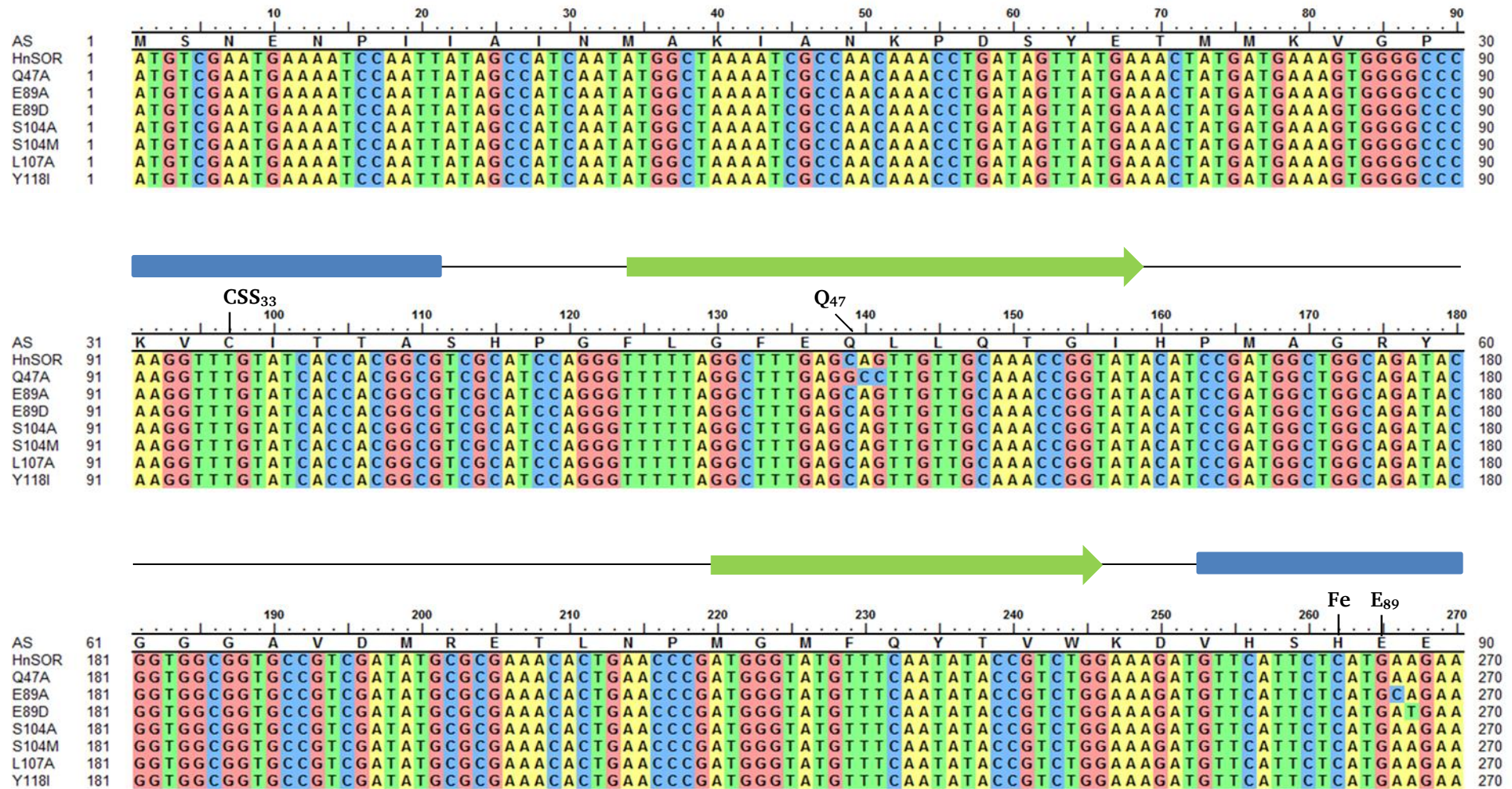




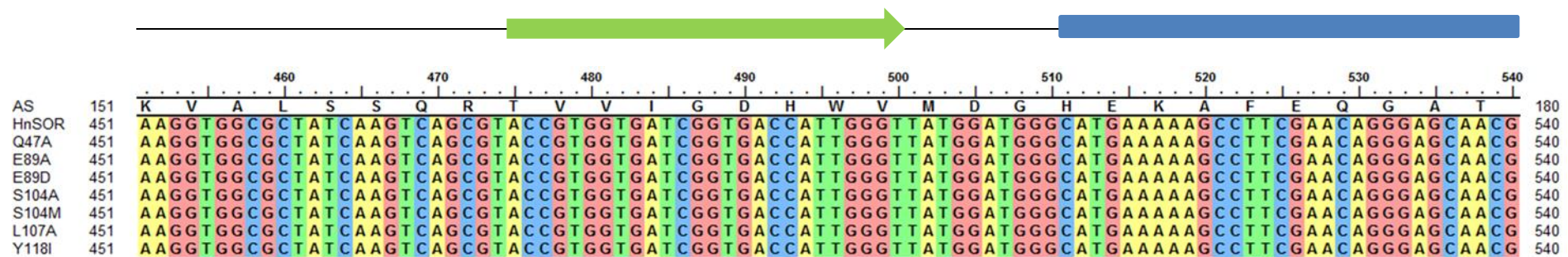
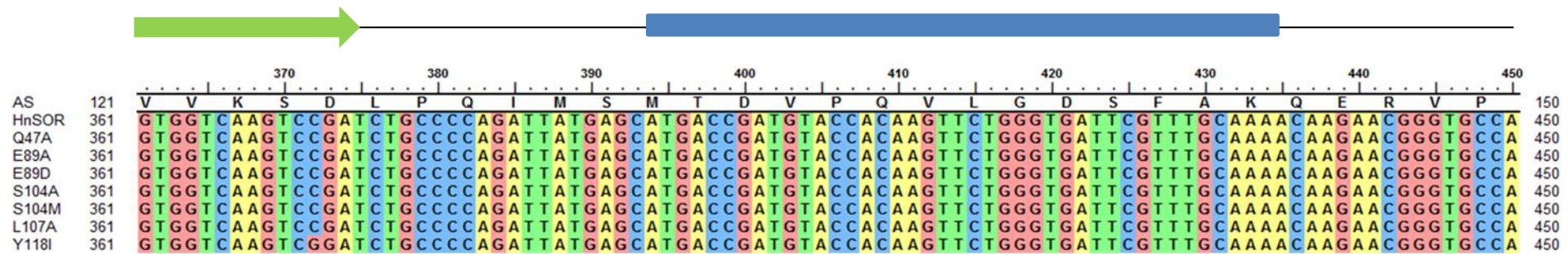
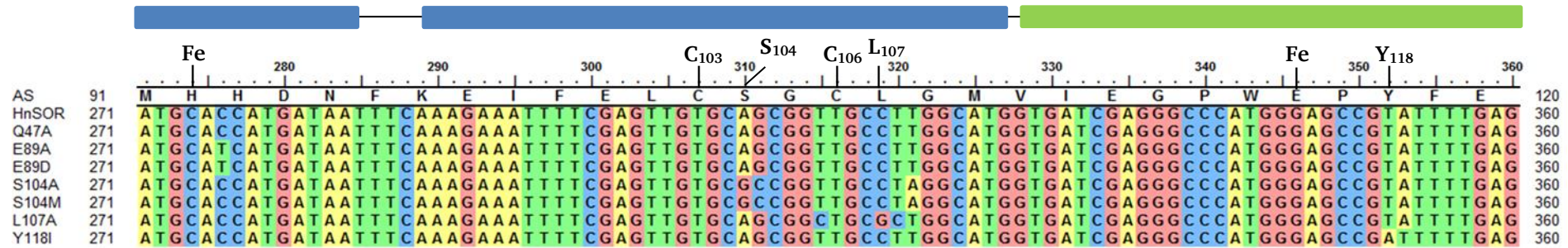




## HnSOR:

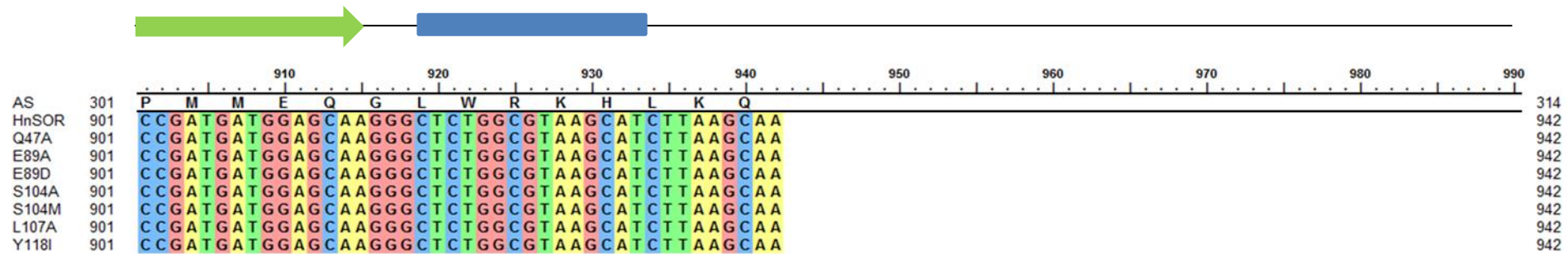
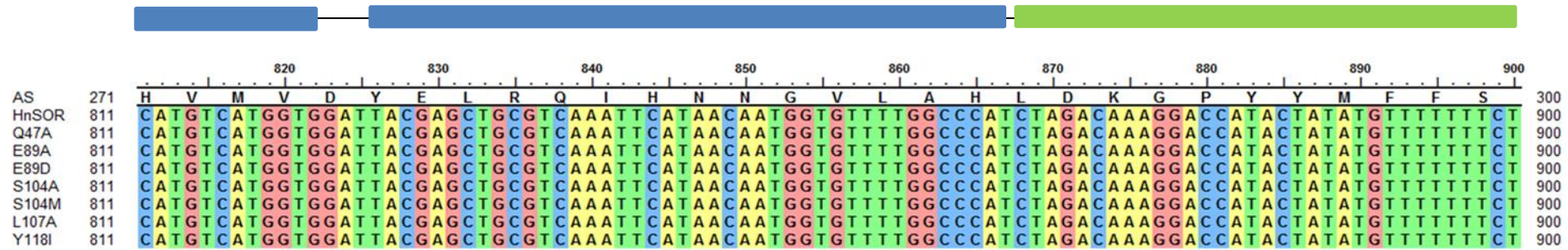














---

## Literaturverzeichnis

---

Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**:213-221.

Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD. 2012. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**:352-367.

Anemüller S, Schmidt CL, Pacheco I, Schafer G, Teixeira M. 1994. A Cytochrome Aa(3)-Type Quinol Oxidase from *Desulfurolobus Ambivalens*, the Most Acidophilic Archaeon. *FEMS Microbiol Lett* **117**:275-280.

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**:195-201.

Bandeiras TM, Salgueiro C, Kletzin A, Gomes CM, Teixeira M. 2002. *Acidianus ambivalens* type-II NADH dehydrogenase: genetic characterisation and identification of the flavin moiety as FMN. *FEBS Lett* **531**:273-277.

Bandeiras TM, Refojo PN, Todorovic S, Murgida DH, Hildebrandt P, Bauer C, Pereira MM, Kletzin A, Teixeira M. 2009. The cytochrome ba complex from the thermoacidophilic crenarchaeote *Acidianus ambivalens* is an analog of bc(1) complexes. *BBA-Bioenergetics* **1787**:37-45.

Bartlett PD, Cox EF, Davis RE. 1961. Reactions of Elemental Sulfur .4. Catalytic Effects in Reaction of Sulfur with Triphenylphosphine. *J Am Chem Soc* **83**:103

Black SP, Sandersa JK, Stefankiewicz AR. 2014. Disulfide exchange: exposing supramolecular reactivity through dynamic covalent chemistry. *Chem Soc Rev* **43**:1861-1872.

Brasseur G, Levican G, Bonnefoy V, Holmes D, Jedlicki E, Lemesle-Meunier D. 2004. Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc(1) complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BBA-Bioenergetics* **1656**:114-126.

Böhm G, Muhr R, Jaenicke R. 1992. Quantitative Analysis of Protein Far UV Circular Dichroism Spectra by Neural Networks. *Protein Eng* **5**: 191-195.

Bradford MM. 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.

Brito JA, Sousa FL, Stelter M, Bandeiras TM, Vonrhein C, Teixeira M, Pereira MM, Archer M. 2009. Structural and Functional Insights into Sulfide:Quinone Oxidoreductase. *Biochemistry* **48**:5613-5622.

Brujinincx PCA, van Koten G, Gebbink RJMK. 2008. Mononuclear non-heme iron enzymes with the 2-His-1-carboxylate facial triad: recent developments in enzymology and modeling studies. *Chem Soc Rev* **37**:2716-2744.



---

**Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC.** 2010. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**:12-21.

**Chen ZW, Jiang CY, She QX, Liu SJ, Zhou PJ.** 2005. Key role of cysteine residues in catalysis and subcellular localization of sulfur oxygenase-reductase of *Acidianus tengchongensis*. *Appl Environ Microb* **71**:621-628.

**Chen ZW, Liu YY, Wu JF, She Q, Jiang CY, Liu SJ.** 2007. Novel bacterial sulfur oxygenase reductases from bioreactors treating gold-bearing concentrates. *Appl Microbiol Biot* **74**:688-698.

**Chen ZW, Jiang CY, Liu SJ.** 2009. Site-directed mutagenesis reveals new and essential elements for iron-coordination of the sulfur oxygenase reductase from the acidothermophilic *Acidianus tengchongensis*. *Chinese Sci Bull* **54**:652-657.

**Chen LX, Ren YL, Lin JQ, Liu XM, Pang X, Lin JQ.** 2012. *Acidithiobacillus caldus* Sulfur Oxidation Model Based on Transcriptome Analysis between the Wild Type and Sulfur Oxygenase Reductase Defective Mutant. *Plos One* **7**(9):e39470

**Cherney MM, Zhang Y, James M, Weiner JH.** 2012. Structure–activity characterization of sulfide:quinone oxidoreductase variants. *J Struct Biol* **178**: 319–328

**Chovancova E, Pavelka A, Benes P, Strnad O, Brezovsky J, Kozlikova B, Gora A, Sustr V, Klvana M, Medek P, Biedermannova L, Sochor J, Damborsky J.** 2012. CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures. *PLoS Comput Biol* **8**:e1002708.

**Clementi E, Raimond DL, Reinhardt WP.** 1967. Atomic Screening Constants from SCF Functions. II. Atoms with 37 to 86 Electrons. *J Chem Phys* **47**:1300–1307

**Costas M, Mehn MP, Jensen MP, Que L.** 2004. Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: Enzymes, models, and intermediates. *Chem Rev* **104**:939-986.

**Curatti L, Ludden PW, Rubio LM.** 2008. NifB-dependent *in vitro* synthesis of the iron–molybdenum cofactor of nitrogenase. In: *Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture*, editiert von Dakora FD *et al.*, Springer, Dodrecht, pp. 329-330

**Das TK, Gomes CM, Bandejas TM, Pereira MM, Teixeira M, Rousseau DL.** 2004. Active site structure of the aa(3) quinol oxidase of *Acidianus ambivalens*. *BBA-Bioenergetics* **1655**:306-320.

**DeLano WL.** 2002. The PyMOL Molecular Graphics System, 0.97 Edn. San Carlos, CA: DeLano Scientific.

**Dopson M, Johnson DB.** 2012. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environ Microbiol* **14**:2620-2631.

**Dunn MF, Pattison SE, Storm MC, Quiel E.** 1980. Comparison of the Zinc-Binding Domains in the 7s Nerve Growth-Factor and the Zinc Insulin Hexamer. *Biochemistry* **19**:718-725.

**Emerson JP, Kovaleva EG, Farquhar ER, Lipscomb JD, Que L.** 2008. Swapping metals in Fe- and Mn-dependent dioxygenases: Evidence for oxygen activation without a change in metal redox state. *P Natl Acad Sci USA* **105**:7347-7352.

- 
- Emmel T, Sand W, König WA, Bock E.** 1986. Evidence for the Existence of a Sulfur Oxygenase in *Sulfolobus brierleyi*. J Gen Microbiol **132**:3415-3420.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K.** 2010. Features and development of Coot. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**: 486-501.
- Fischer DS and Price DC.** 1964. A Simple Serum Iron Method Using the New Sensitive Chromogen Tripyridyl-s-triazine. Clin Chem **10**: 21-31.
- Franz B, Lichtenberg H, Hormes J, Modrow H, Dahl C, Prange A.** 2007. Utilization of solid 'elemental' sulfur by the phototrophic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: a sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy study. Microbiology **153**:1268-1274.
- Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A, Fischer J.** 2005. Prokaryotic sulfur oxidation. Curr Opin Microbiol **8**:253-259.
- Friedrich CG, Quentmeier A, Bardischewsky F, Rother D, Orawski G, Hellwig P, Fischer J.** 2008. Redox Control of Chemotrophic Sulfur Oxidation of *Paracoccus pantotrophus*. In: Microbial Sulfur Metabolism, editiert von Dahl C, Friedrich CG. Springer, Berlin, pp. 139-150.
- Frigaard NU, Dahl C.** 2009. Sulfur Metabolism in Phototrophic Sulfur Bacteria. Adv Microb Physiol **54**:103-200.
- Frishman D, Argos P.** 1995. Knowledge-based protein secondary structure assignment. Proteins **23**:566-579.
- Fuchs T, Huber H, Burggraf S, Stetter KO.** 1996. 16S rDNA-based phylogeny of the archaeal order Sulfolobales and reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb. nov. Syst Appl Microbiol **19**:56-60.
- Gaffney BJ, Su C, Oliw EH.** 2001. Assignment of EPR Transitions in a Manganese-Containing Lipoyxygenase and Prediction of Local Structure. Appl Magn Reson **21**:413-424.
- Ghosh W, Dam B.** 2009. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. FEMS Microbiol Rev **33**:999-1043.
- Giggenbach W.** 1972. Optical-Spectra and Equilibrium Distribution of Polysulfide Ions in Aqueous Solution at 20 Degrees. Inorg Chem **11**:1201.
- Giuffre A, Gomes CM, Antonini G, DIttri E, Teixeira M, Brunori M.** 1997. Functional properties of the quinol oxidase from *Acidianus ambivalens* and the possible catalytic role of its electron donor - Studies on the membrane-integrated and purified enzyme. Eur J Biochem **250**:383-388.
- Gomes CM, Lemos RS, Teixeira M, Kletzin A, Huber H, Stetter KO, Schafer G, Anemuller S.** 1999. The unusual iron sulfur composition of the *Acidianus ambivalens* succinate dehydrogenase complex. BBA Bioenergetics **1411**:134-141.
- Gomes CM, Bandejas TM, Teixeira M.** 2001. A new type-II NADH dehydrogenase from the archaeon *Acidianus ambivalens*: Characterization and in vitro reconstitution of the respiratory chain. J Bioenerg and Biomembr **33**:1-8.
- Gregersen LH, Bryant DA, Frigaard NU.** 2011. Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria. Front Microbiol **2**: 116

- 
- Grimm F, Franz B, Dahl C.** 2008. Thiosulfate and Sulfur Oxidation in Purple Sulfur Bacteria. In: Microbial Sulfur Metabolism, editiert von Dahl, C. & Friedrich, C. G. Springer, Berlin, pp. 101-116
- Hedderich R, Hamann N, Bennati M.** 2005. Heterodisulfide reductase from methanogenic archaea: a new catalytic role for an iron-sulfur cluster. *Biol Chem* **386**:961-970.
- Hensen D, Sperling D, Truper HG, Brune DC, Dahl C.** 2006. Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Mol Microbiol* **62**:794-810.
- Heunisch GW.** 1977. Stoichiometry of Reaction of Sulfites with Hydrogen-Sulfide Ion. *Inorg Chem* **16**:1411-1413.
- Hosono T, Fukao T, Ogihara J, Ito Y, Shiba H, Seki T, Ariga T.** 2005. Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin. *J Biol Chem* **280**:41487-41493.
- Hutchinson EG, Thornton JM.** 1996. PROMOTIF - A program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci* **5**:212-220.
- Huheey JE, Keiter EA, Keiter RL.** 2012. Anorganische Chemie, Prinzipien von Struktur und Reaktivität. De Gruyter, Berlin, pp 471-472.
- Janosch C, Thyssen C, Vera M, Bonnefoy V, Rohwerder T, Sand W.** 2009. Sulfur oxygenase reductase in different *Acidithiobacillus caldus*-like strains. *Adv Materials Res* **71-73**: 239-242.
- Janosch C, Remonsellez F, Sand W, Vera M.** 2015. Sulfur Oxygenase Reductase (Sor) in the Moderately Thermoacidophilic Leaching Bacteria: Studies in *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* and *Acidithiobacillus caldus*. *Microorganisms* **3**: 707-724.
- Kabil O, Banerjee R.** 2012. Characterization of Patient Mutations in Human Persulfide Dioxygenase (ETHE1) Involved in H<sub>2</sub>S Catabolism. *J Biol Chem* **287**:44561-44567.
- Kabsch W.** 2010. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**:125-132.
- Kamyshny A.** 2009. Solubility of cyclooctasulfur in pure water and sea water at different temperatures. *Geochim Cosmochim Acta* **73**:6022-6028.
- Kantardjieff KA, Rupp B.** 2003. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* **12**:1865-1871.
- Karshikoff A, Ladenstein R.** 2001. Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. *Trends Biochem Sci* **26**: 550-556.
- King TE, Morris RO.** 1967. Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl groups. *Methods Enzymol* **10**: 634-641.
- Kingston HM, Greenberg RR.** 1984. An Elemental Rationing Technique for Assessing Concentration Data from a Complex Water System. *Environ Inter* **10**: 153-153.
- Kletzin A.** 1989. Coupled Enzymatic Production of Sulfite, Thiosulfate, and Hydrogen-Sulfide from Sulfur - Purification and Properties of a Sulfur Oxygenase Reductase from the Facultatively Anaerobic Archaeobacterium *Desulfurolobus ambivalens*. *J Bacteriol* **171**:1638-1643.

---

**Kletzin A.** 1994. Sulfur Oxidation and Reduction in Archaea - Sulfur Oxygenase/Reductase and Hydrogenases from the Extremely Thermophilic and Facultatively Anaerobic Archaeon *Desulfurolobus ambivalens*. Syst Appl Microbiol **16**:534-543.

**Kletzin A.** 2008. Oxidation of Sulfur and Inorganic Sulfur Compounds in *Acidianus ambivalens*. In: Microbial Sulfur Metabolism, editiert von Dahl, C. & Friedrich, C. G. Springer, Berlin, pp 184-201.

**Klimmek O, Kröger A, Steudel R, Holdt G.** 1991. Growth of *Wolinella-Succinogenes* with Polysulfide as Terminal Acceptor of Phosphorylative Electron-Transport. Arch Microbiol **155**:177-182.

**Knapp G, Muller K, Strunz M, Wegscheider W.** 1987. Automation in Element Preconcentration with Chelating Ion-Exchangers - Plenary Lecture. J Anal Atom Spectrom **2**:611-614.

**Kozlikova B, Sebestova E, Sustr V, Brezovsky J, Strnad O, Daniel L, Bednar D, Pavelka A, Manak M, Bezdeka M, Benes P, Kotry M, Gora A, Damborsky J, Sochor J.** 2014. CAVER Analyst 1.0: graphic tool for interactive visualization and analysis of tunnels and channels in protein structures. Bioinformatics **30**:2684-2685.

**Krissinel E, Henrick K.** 2004. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**:2256-2268.

**Li M, Chen ZW, Zhang PF, Pan XW, Jiang CY, An XM, Liu SJ, Chang WR.** 2008. Crystal structure studies on sulfur oxygenase reductase from *Acidianus tengchongensis*. Biochem Biophys Res Comm **369**:919-923.

**Liu HL, Xin YF, Xun LY.** 2014. Distribution, Diversity, and Activities of Sulfur Dioxygenases in Heterotrophic Bacteria. Appl Environ Microb **80**:1799-1806.

**Mangold S, Valdes J, Holmes DS, Dopson M.** 2011. Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. Front Microbiol **2**:17

**Matthews BW.** 1968. Solvent content of protein crystals. J Mol Biol **33**:491-497.

**McC Campbell Hamilton E.** 1991. The chemistry of low valent sulfur compounds in the sulfur-water system. Master Thesis, University of Minnesota, Minneapolis/St. Paul, USA.

**McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ.** 2007. Phaser crystallographic software. J Appl Crystallogr **40**:658-674.

**McFerrin MB, Snell EH.** 2002. The development and application of a method to quantify the quality of cryoprotectant solutions using standard area-detector X-ray images. J Appl Crystallogr **35**:538-545.

**McIlvaine TC.** 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. J Biol Chem **49**: 183-186.

**Merkx M, Averill BA.** 1998. Ga<sup>3+</sup> as a functional substitute for Fe<sup>3+</sup>: preparation and characterization of the Ga<sup>3+</sup>Fe<sup>2+</sup> and Ga<sup>3+</sup>Zn<sup>2+</sup> forms of bovine spleen purple acid phosphatase. Biochemistry **37**:8490-8497.

**Miller AF, Yikilmaz E, Porta J, Grove LE, Bronshteyn Y, Xie J, Vahedi-Faridi A, Rodgers DW, Brunold TC, Borgstahl GE.** 2007. CATL 40-Redox tuning over 100s of mV via H-bonding and control of redox-coupled protons, in superoxide dismutase. Abstr Pap Am Chem S **234**.

---

**Mishanina TV, Libiad M, Banerjee R.** 2015. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat Chem Biol* **11**:457-464.

**Müller FH, Bandejas TM, Urich T, Teixeira M, Gomes CM, Kletzin A.** 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol Microbiol* **53**:1147-1160.

**Münchberg U, Anwar A, Mecklenburg S, Jacob C.** 2007. Polysulfides as biologically active ingredients of garlic. *Org Biomol Chem* **5**:1505-1518

**Pachmair F.** 1960. Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. Dissertation, München: Justus-Maximilian Universität.

**Pai SC, Chen TC, Wong GTF, Hung CC.** 1990. Maleic-Acid Ammonium Hydroxide Buffer System for Preconcentration of Trace-Metals from Seawater. *Anal Chem* **62**:774-777.

**Pau MYM, Lipscomb JD, Solomon E.** 2007. Substrate activation for O<sub>2</sub> reactions by oxidized metal centers in biology. *P Natl Acad Sci USA* **104**:18355-18362.

**Pella PA, Kingston HM, Sieber JR, Feng LY.** 1983. Effect of sample dissolution procedures on X-ray spectrometric analysis of biological materials. *Anal Chem* **55**:1193-1194.

**Pelletier N, Leroy G, Guiral M, Giudici-Ortoni MT, Aubert C.** 2008. First characterisation of the active oligomer form of sulfur oxygenase reductase from the bacterium *Aquifex aeolicus*. *Extremophiles* **12**:205-215.

**Pickerin TL, Saunders KJ, Tobolsky AV.** 1967. Disproportionation of Organic Polysulfides. *J Am Chem Soc* **89**:2364-2367.

**Protze J, Müller F, Lauber K, Nass B, Mentele R, Lottspeich F, Kletzin A.** 2011. An extracellular tetrathionate hydrolase from the thermoacidophilic archaeon *Acidianus ambivalens* with an activity optimum at pH 1. *Front Microbiol* **2**:68

**Quatrini R, Appia-Ayme C, Denis Y, Jedlicki E, Holmes DS, Bonnefoy V.** 2009. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics* **10**:394

**Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V.** 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* **7**:95-99.

**Rohwerder T, Sand W.** 2003. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* **149**:1699-1709.

**Rohwerder T, Sand W.** 2007a. Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Eng Life Sci* **7**:301-309.

**Rohwerder T, Sand W.** 2007b. Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation. In: *Microbial Processing of Metal Sulfides*, editiert von Edgardo R. Donati & Wolfgang Sand. Springer, New York, pp 35-58.

**Rohwerder T, Sand W.** 2008. Properties of thiols required for sulfur dioxygenase activity at acidic pH. *J Sulfur Chem* **29**:293-302.



---

**Rother D, Henrich HJ, Quentmeier A, Bardischewsky F, Friedrich CG.** 2001. Novel genes of the sox gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J Bacteriol* **183**:4499-4508.

**Roy AB, Trudinger PA.** 1970. The chemistry of some sulphur compounds. Cambridge University, Cambridge, UK: Cambridge University Press

**Rühl P.** 2015. Strukturelle und funktionale Analysen von Schwefel-Oxygenasen/-Reduktasen. Master-Thesis, Technische Universität Darmstadt.

**Schägger H, Von Jagow G.** 1987. Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1-Kda to 100-Kda. *Anal Biochem* **166**:368-379.

**Sattler SA, Wang X, Lewis KM, Dehan PJ, Park CM, Xin YF, Liu HL, Xian M, Xun LY, Kang C.** 2015. Characterizations of Two Bacterial Persulfide Dioxygenases of the Metallo-beta-lactamase Superfamily. *J Biol Chem* **290**:18914-18923.

**Schauder R, Kröger A.** 1993. Bacterial Sulfur Respiration. *Arch Microbiol* **159**:491-497.

**Schenk G, Neidig ML, Zhou J, Holman TR, Solomon EI.** 2003. Spectroscopic characterization of soybean lipoxygenase-1 mutants: the role of second coordination sphere residues in the regulation of enzyme activity. *Biochemistry* **42**:7294-7302.

**Sehnal D, Svobodova Varekova R, Berka K, Pravda L, Navratilova V, Banas P, Ionescu CM, Otyepka M, Koca J.** 2013. MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. *J Cheminform* **5**:39.

**Seyfarth K.** 2006. Gerichtete Mutagenese zur Funktionsbestimmung einzelner Aminosäuren aus der Schwefel Oxygenase- /Reduktase. Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.

**Slater JC.** 1964. Atomic radii in crystals. *J. Chem. Phys.* **41**:3199-3204

**Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.

**Solé VA, Papillon E, Cotte M, Walter Ph, Susini J.** 2007. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra, *Spectrochim. Acta Part B* **62**: 63-68.

**Sorokin DY, Berben T, Melton ED, Overmars L, Vavourakis CD, Muyzer G.** 2014. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles* **18**:791-809.

**Steudel R.** 2000. The chemical sulfur cycle. In: Environmental Technologies to treat Sulfur Pollutions. Editiert von Lens, P. & Hulshoff, L., Pol. London: IWA Publishing.

**Sun CW, Chen ZW, He ZG, Zhou PJ, Liu SJ.** 2003. Purification and properties of the sulfur oxygenase/reductase from the acidothermophilic archaeon, *Acidianus* strain S5. *Extremophiles* **7**:131-134.

**Szajewski RP, Whitesides GM.** 1980. Rates of thiol-disulfide interchange reactions involving proteins and kinetic measurements of thiol pKa values. *J Chem Soc.* **102**: 2011.

---

**Thauer RK, Jungermann K, Decker K.** 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**:100-180.

**Urich T, Bandejas TM, Leal SS, Rachel R, Albrecht T, Zimmermann P, Scholz C, Teixeira M, Gomes CM, Kletzin A.** 2004. The sulphur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is a multimeric protein containing a low-potential mononuclear non-haem iron centre. *Biochem J* **381**:137-146.

**Urich T, Kroke A, Bauer C, Seyfarth K, Reuff M, Kletzin A.** 2005a. Identification of core active site residues of the sulfur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* by site-directed mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett* **248**:171-176.

**Urich T, Coelho R, Kletzin A, Frazao C.** 2005b. The sulfur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is an icosatetramer as shown by crystallization and Patterson analysis. *BBA Proteins Proteomics* **1747**:267-270.

**Urich T.** 2005c. The sulfur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* - Functional and structural characterization of a sulfur-disproportionating enzyme. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, Germany.

**Urich T, Gomes CM, Kletzin A, Frazao C.** 2006. X-ray structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme. *Science* **311**:996-1000.

**Veith A.** 2011a. Sulfur Oxygenase Reductases - A Structural and Biochemical Perspective. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt.

**Veith A, Urich T, Seyfarth K, Protze J, Frazao C, Kletzin A.** 2011b. Substrate pathways and mechanisms of inhibition in the sulfur oxygenase reductase of *Acidianus ambivalens*. *Front Microbiol* **2**.

**Veith A, Botelho HM, Kindinger F, Gomes CM, Kletzin A.** 2012. The Sulfur Oxygenase Reductase from the Mesophilic Bacterium *Halothiobacillus neapolitanus* is a Highly Active Thermozyyme. *J of Bacteriol* **194**:677-685.

**Wakai S, Kikumoto M, Kanao T, Kamimura K.** 2004. Involvement of Sulfide:Quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci Biotech Bioch* **68**:2519-2528.

**Wang G, Guo R, Bartlam M, Yang H, Xue H, Liu Y, Huang L, Rao Z.** 2003. Crystal structure of a DNA binding protein from the hyperthermophilic euryarchaeon *Methanococcus jannaschii*. *Protein Sci* **12**:2815-2822.

**Wang HY, Liu SS, Liu XM, Li XT, Wen Q, Lin JQ.** 2014. Identification and characterization of an ETHE1-like sulfur dioxygenase in extremely acidophilic *Acidithiobacillus* spp. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:7511-7522.

**Zhang HJ, Guo WB, Xu CA, Zhou HB, Chen XH.** 2013. Site-specific mutagenesis and functional analysis of active sites of sulfur oxygenase reductase from Gram-positive moderate thermophile *Sulfobacillus acidophilus* TPY. *Microbiol Res* **168**:654-660.

**Zillig W, Yeats S, Holz I, Bock A, Gropp F, Rettenberger M, Lutz S.** 1985. Plasmid-Related Anaerobic Autotrophy of the Novel Archaeobacterium *Sulfolobus-Ambivalens*. *Nature* **313**:789-791.

---

**Zillig W, Yeats S, Holz I, Bock A, Rettenberger M, Gropp F, Simon G.** 1986. *Desulfurolobus-Ambivalens*, Gen-Nov, Sp-Nov, an Autotrophic Archaeobacterium Facultatively Oxidizing or Reducing Sulfur. *Syst Appl Microbiol* **8**:197-203.

**Zimmermann P, Laska S, Kletzin A.** 1999. Two modes of sulfite oxidation in the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Arch Microbiol* **172**:76-82.

---

## Appendix

---

Die in den Kapiteln dieser Arbeit beschriebenen Kristallstrukturen sind noch nicht öffentlich in der Protein Data Bank zugänglich. Die beiliegende DVD enthält die Koordinaten der Strukturen im \*.pdb-Format und die zugehörigen Elektronendichtekarten im \*.mtz-Format oder als \*.map-Datei. Die Daten basieren auf dem in dieser Arbeit beschriebenen Stand des *Refinements*. Zur Visualisierung von 3D-Strukturen wurde in dieser Arbeit PyMOL verwendet. Für die zusätzliche Darstellung der Elektronendichtekarten wird die Nutzung von WinCOOT empfohlen.

Dateiname	Struktur
<b>HnSOR</b>	Wildtyp der <i>H. neapolitanus</i> SOR
<b>DATS-SOR</b>	Mit Diallyltrisulfid inhibierte <i>Ac. ambivalens</i> SOR
<b>DDS-SOR</b>	Mit Dimethyldisulfid inhibierte <i>Ac. ambivalens</i> SOR
<b>DTBPS-SOR</b>	Mit Di- <i>tert</i> -butyl-Polysulfid inhibierte <i>Ac. ambivalens</i> SOR
<b>Co-SOR</b>	Derivat der <i>Ac. ambivalens</i> SOR, rückgefaltet mit Cobalt
<b>Ga-SOR</b>	Derivat der <i>Ac. ambivalens</i> SOR, rückgefaltet mit Gallium
<b>Mn-SOR</b>	Derivat der <i>Ac. ambivalens</i> SOR, rückgefaltet mit Mangan
<b>Ni-SOR</b>	Derivat der <i>Ac. ambivalens</i> SOR, rückgefaltet mit Nickel
<b>Y102G</b>	Variante der <i>Ac. ambivalens</i> SOR mit Substitution von Y <sub>102</sub> zu G
<b>I47W</b>	Variante der <i>Ac. ambivalens</i> SOR mit Substitution von I <sub>47</sub> zu W

---

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

---

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn PD Dr. rer. nat. Arnulf Kletzin im Fachbereich Biologie, Fachgebiet Mikrobiologie und Archaea, der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von Januar 2013 bis August 2016 angefertigt. Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Oeiras, Portugal, in der Arbeitsgruppe von Dr. Carlos Frazão und Prof. Miguel Teixeira im Rahmen einer Kooperation durchgeführt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht

Darmstadt, den 31.08.2016

Uwe Pöll



---

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

---

Name: Uwe Pöll

Geburtsdatum: 22.10.1986

Geburtsort: Worms

### Akademische Ausbildung

---

2013 – 2016 Promotionsarbeit bei Herrn Dr. Arnulf Kletzin an der Technischen Universität Darmstadt  
Titel: „Schwefel-Oxygenasen/-Reduktasen aus *Acidianus ambivalens* und *Halothiobacillus neapolitanus*“

2012 Diplomarbeit bei Herrn Dr. Arnulf Kletzin an der Technischen Universität Darmstadt  
Titel: „Cytochrome aus dem hyperthermophilen Archaeon *Ignicoccus hospitalis*“

2007 – 2012 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt  
Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie, Pflanzenphysiologie

### Schulbildung

---

2006 Abitur am Lessing-Gymnasium Lampertheim

---

## Danksagung

---

Ein ganz besonderer Dank geht an **Dr. Arnulf Kletzin** für die Bereitstellung dieses äußerst interessanten Themas und die Bereitschaft, zu jeder Zeit Ideen, Fragen und Probleme zu diskutieren und stets mit fachlichen Ratschlägen weiterzuhelfen.

**Prof. Dr. Felicitas Pfeifer** möchte ich sowohl für die Übernahme des Koreferats danken, als auch für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei **Dr. Carlos Frazão** für die umfassende Unterstützung während und nach meiner Zeit am ITQB bedanken. Hervorgehoben sei dabei die geduldige Einarbeitung in das Gebiet der Kristallographie, die permanente Bereitschaft, Fragen zu beantworten und Ergebnisse zu diskutieren sowie die unermüdliche Ausdauer bei der Analyse und Auswertung der kristallographischen Daten.

Weiterhin danke ich **Prof. Miguel Teixeira** und **Célia V. Romão** (ITQB) für die Unterstützung bei der ESR-Spektroskopie.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Prof. Andreas Klingl** für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Danke auch an **Philipp Czechowski** für die Durchführung der CD-Spektroskopie und die Bereitschaft, auch kurzfristig die ein oder andere Probe zu analysieren.

Ein großer Dank geht auch an alle Kollegen der vergangenen Jahre, die stets hilfsbereit waren und neben einer tollen Arbeitsatmosphäre zu einer unvergesslichen Zeit beigetragen haben. Genannt seien hier vor allem **Sabrina Fröls**, **Gisela Schaffert**, **Dennis Petrasch**, **Gerald Losensky**, **Stella Tavlaridou**, **Johannes Born**, **Sabrina Völkel**, **Kerstin Winter** und **Doreen Haase**. Ein besonderer Dank geht dabei an **Patrick Rühl** und **Patrick Haas**. Dank Euch war die Arbeit immer lustig und abwechslungsreich. Abgesehen davon hatte ich selten einen so schönen Schreibtisch!

Besonders danken möchte ich meiner Freundin **Regina**, die während der letzten Jahre immer an meiner Seite stand, stets an mich geglaubt hat und für mich da war.

Mein größter Dank gilt **meiner Familie**, die mich nicht nur während der Doktorarbeit, sondern auch während meines gesamten Studiums unterstützt hat.